

**Entwicklung einer *in vitro*-Tierversuchersatzmethode für
sicherheitstoxikologische Untersuchungen unter
Verwendung von Lab-on-Chip-Systemen**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Sebastian Bühler

geb. am 20. Februar 1978
in Ostfildern, Deutschland

Rostock, Juni 2012

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. Jan Gimsa
Lehrstuhl für Biophysik, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. Rita Bernhardt
Lehrstuhl für Biochemie, Universität des Saarlandes

Datum der Einreichung: 04. Juni 2012

Datum der Verteidigung: 18. Juli 2012

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	iii
2. Abkürzungsverzeichnis.....	vi
3. Einleitung.....	1
4. Material Methoden.....	10
4.1 Analysesysteme	10
4.1.1 Luminometer	10
4.1.2 Bionas-Analyzing-System 2500 und Metabolic-Chip SC 1000	10
4.1.3 Modulares Glaschipsystem.....	12
4.2 Zellkultur	14
4.2.1 Medien für die Kultivierung und Messung mit Parathion	14
4.2.2 Medien für die Kultivierung und Messung mit Natriumvalproinsäure	15
4.2.3 Lösungen für die Reinigung und Beschichtung von Metabolic Chips SC 1000, 48-Wells und Glasneurochips	16
4.2.4 Primärzellgewinnung	17
4.2.5 Monolayer-ES-D3-Stammzellkultivierung.....	17
4.2.6 Bestimmung der optimalen Zellzahlen	17
4.2.7 Monolayer-ES-D3-Stammzelldifferenzierung	18
4.2.8 Hanging-Drop-ES-D3-Stammzellkultivierung und -differenzierung.....	18
4.2.9 Aussaat von Zellen mit Parathion und Natriumvalproinsäure	19
4.2.10 Anforderung an die Zellkultur und Medien in Metabolic Chips SC 1000 und Glasneurochips	19
4.3 Eingrenzung des Messbereichs von Parathion und Natriumvalproinsäure .	20
4.4 Bestimmung des IC ₅₀ des intrazellulären ATP-Gehaltes.....	21
4.5 Metabolic Chip SC 1000-Messungen.....	21
4.5.1 Bezugswerte (Offset-Werte) der Sensoren	23
4.5.2 Methode der Messdatenverarbeitung- und verifizierung	24
4.5.3 Fitgleichungen und Auswertung von Messdaten.....	25
5. Ergebnisse.....	28
5.1 Bionas-Analyzing-System 2500	28
5.1.1 Elektrische Kontakte und Verbindungen	28
5.1.2 Sensoren	28
5.1.3 Durchflusssystem	29

5.1.4	Leerwertbetrachtung.....	32
5.2	Modulares Glaschipsystem	33
5.2.1	Signalableitungsprobleme	33
5.3	Zellkultur	34
5.3.1	Primärzellkultur.....	34
5.3.2	ES-D3-Stammzellkultur und -differenzierung	34
5.3.3	Alternative ES-D3-Zellkultur und Differenzierung: Hanging-Drop-Verfahren	36
5.4	Austestung der Medien	38
5.5	Einfluss von Parathion und Natriumvalproinsäure auf neuronale Zellen	38
5.5.1	Testsubstanzen	38
5.6	Parathion.....	39
5.6.1	Messung der metabolischen Parameter mit dem Bionas-Analyzing-System 2500	40
5.6.2	Zusammenfassung	43
5.7	Natriumvalproinsäure	44
5.7.1	Messung der spontanen elektrischen Aktivität und der metabolischen Parameter mit Glasneurochips und Metabolic Chips.....	45
5.7.2	Messung der elektrischen Aktivität mit dem Modularen Glaschipsystem	45
5.7.3	Messung der Zelladhäsion mit dem Modularen Glaschip System	46
5.7.4	Zusammenfassung und Vergleich aller Messungen mit Natriumvalproinsäure.	48
6.	Diskussion.....	54
6.1	Silizium- und Glaschipsysteme	54
6.2	Zum Zusammenhang zwischen IC_{50} - <i>in vitro</i> - und LD_{50} - <i>in vivo</i> -Werten	55
6.3	Hormese - Bedeutung und Problematik	58
7.	Zusammenfassung	63
8.	Ausblick	65
9.	Literaturverzeichnis	x
10.	Liste eigener Veröffentlichungen	xxvii
10.1	Publikationen.....	xxvii
10.2	Konferenzbeiträge	xxviii
10.3	Poster	xxix
11.	Danksagung	xxx

12. Selbständigkeitserklärung	xxxi
--	-------------

2. Abkürzungsverzeichnis

ABA	Alamar Blue Assay
<i>Abb(n).</i>	Abbildung(en)
ATPA	ATPlite-Assay
BAS	Bionas-Analyzing-System 2500
CM/CM+	MEPC-Kultivierungsmedium/ CM mit den entsprechenden Parathion- und NaVPA-Konzentrationen
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
<i>DIV</i>	Days <i>in vitro</i> (Tage in Kultur ab Aussaat von MEPC und ES-D3-Stammzellen ohne LIF)
EB(s)	Embryoidbody(ies)
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EC ₅₀	halbmaximale Konzentration eines Agonisten oder Antagonisten bei der 50% einer Population einen nicht-letalen jedoch definierten Effekt aufweist (<i>in vitro</i>)
ED ₅₀	halbmaximale Dosis eines Wirkstoffs (Agonisten oder Antagonisten) bei der 50% einer Population einen (therapeutischen) Effekt aufweist.
EDCM	Kultivierungsmedium für Zellen der murinen embryonalen Stammzelllinie D3 (ES-D3-Kulturmedium)
ES-D3-Zellen	Murine embryonale Stammzelllinie D3
EU	European Union
Fb	Fibroblasten

GNC(s)	Glasneurochip(s)
hESC	humane embryonale Stammzellen
hNPC	humane neuronale Progenitorzellen
IC ₅₀	<i>In vitro</i> Konzentration eines Inhibitors (Antagonisten) bei der 50% der Aktivität einer Population (Zellen) inhibiert werden
IDES	interdigitierende Elektrodenstruktur
IF	Immunfluoreszenz
i. m.	intramuskulär
i. p.	intraperitoneal
ISFET	ionensensitiver Feldeffekttransistor
i. v.	intravenös
K _m	halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit eines Substrates durch ein Enzym (K _m). Der K _m -Wert ist vergleichbar mit dem IC ₅₀ -Wert
LD ₅₀	gibt die <i>in vivo</i> -Dosis eines Wirkstoffs an, bei der 50% der eingesetzten Individuen einen definierten Zeitraum nicht überleben
MC(s)	Metabolic Chip(s) SC 1000
MEA	Multielektrodenarray
MEPC	murine embryonale primäre Cortexzellen
MESCC(s)	murine embryonale stammzell-differenzierte kardiale Zellen
MM/MM+/MMT	MEPC-Messmedium ohne NaHCO ₃ für die Messung mit dem BAS/ MM mit

	den entsprechenden Parathion- und NaVPA-Konzentrationen/ MM mit Triton-X-100
mM	Millimol, millimolar
MOGS	Modulares Glaschipsystem
NaVPA	Natriumvalproinsäure
NT2	humane Teratokarzinomazelllinie 2
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
p. o.	peroral
QIF	Qualitative Immunfluoreszenz
REACH	Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals
SCM/SCM+	SNC-Kultivierungsmedium/ SCM mit den entsprechenden Parathion- und NaVPA-Konzentrationen
Si ₃ N ₄	Siliziumnitrid
SM	MEPC-Aussaatmedium
SMM/SMM+/SMMT	SNC-Messmedium ohne NaHCO ₃ für die Messung mit dem BAS/ SMM mit den entsprechenden NaVPA-Konzentrationen/ SMM mit Triton-X-100
SNC	aus der murinen embryonalen Stammzelllinie D3 differenzierte neuronale Zellen
SiO ₂	Siliziumdioxid
US EPA	United States Environmental Protection Agency
V/D	Visuell/ Distanz
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch, ZEBET, Berlin

μM

Mikromol, mikromolar

3. Einleitung

Gegenwärtig werden im Rahmen des Verbraucherschutzes und bei Prüfungen für die Zulassung von Stoffen aus dem Bereich der Chemikalien, Arznei- und Pflanzenschutzmittel oder zur Erkennung bzw. Beurteilung von Umweltgefährdungen jedes Jahr ca. 100 Millionen Tiere bei Tierversuchen verwendet. Tierexperimente sind teilweise gesetzlich vorgeschrieben, werden aber auch in Forschung und Lehre zur Untersuchung von biologischen Vorgängen (z.B. Metabolismus) sowie für die Entstehung von Krankheiten (z. B. Krebs, Alzheimer, Parkinson) und deren Behandlung (z.B. Antikörperproduktion) eingesetzt (<http://translate.google.de/translate?hl=de&langpair=en|de&u=http://www.peta.org/issues/animals-used-for-experimentation/animal-experiments-overview.aspx>.)

Im Zeitalter der zunehmenden Produktion von synthetischen Industrie-, Verbrauchs- und Nahrungsmittelgütern sind ein vermehrtes Auftreten von Allergien und eine Veränderung von Krankheitsbildern beobachtbar. Trotz der rasanten Medikamentenentwicklung sowie einer immer höheren Lebenserwartung rückt die Verminderung der kumulativen Belastung des Menschen durch toxische und entwicklungstoxische Substanzen in das Zentrum des gesellschaftlichen Interesses. Sicherheitstoxikologische Untersuchungen von potentiell gefährlichen Stoffen werden durch gesetzgebende Institutionen (Bundesministerium für Ernährung, Verbraucherschutz und Landwirtschaft, (BMVEL) und das europäische Parlament, REACH-Verordnung(Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals)) geregelt. Die Erarbeitung und Bereitstellung für die Umsetzung der Gesetze und Verordnungen basieren auf Prüfrichtlinien internationaler Organisationen wie z.B. der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) in Europa und der Environmental Protection Agency, (US EPA) in den USA. Alternative Methoden zum Tierversuch bedürfen, bevor sie zu Routinetestungen zugelassen werden, einer wissenschaftlichen und regulativen Validierung durch das Europäische Zentrum für die Validierung von Alternativmethoden zum Tierversuch (ECVAM) (<http://ecvam.jrc.it/>). Die Durchführung der Untersuchungen erfolgt meist durch untergeordnete Behörden wie z.B. das Bundesamt für Risikobewertung (BfR).

Im Rahmen der 2007 in Kraft getretenen REACH-Verordnung werden u.a. für alle in der Europäischen Union (EU) neu entwickelten und importierten Substanzen, die für den kommerziellen und industriellen Markt vorgesehen sind und deren Produktionsmenge mehr als eine Tonne pro Jahr beträgt, die Testung auf Toxizität und deren Registrierung verlangt (Amtsblatt der Europäischen Union; Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates; 18. 12. 2006, 21, (59)). Weiterhin wird z.B. aufgrund neuer Erkenntnisse über das entwicklungsneurotoxische Potential von Pestiziden im Hinblick auf die Entwicklung des kindlichen Gehirns, die Untersuchung der Entwicklungsneurotoxizität für alle industriell hergestellten und bereits existierenden Stoffe in die REACH-Verordnung in Anlehnung an die U.S. EPA Test Guideline 870.6300 (EPA 1998) und die OECD (OECD 2007) Richtlinie TG 426, diskutiert. Ein solcher Test zur Detektion der Entwicklungsneurotoxizität erfordert derzeit bis zu ca. 140 murine Mutter- und 1000 Jungtiere und dauert mindestens drei Monate. Neben den beträchtlichen Unterhaltskosten für die Tiere sind die aus den Versuchen gewinnbaren Erkenntnisse aus wissenschaftlicher Sicht fragwürdig. Desweiteren besteht die ethische Forderung der Bevölkerung, die Anzahl der Tierversuche zu reduzieren bzw. einzustellen. Dennoch kann gegenwärtig und wohl auch in absehbarer Zukunft auf eine Reihe von Tierversuchen nicht verzichtet werden. Aus diesen Gründen entsteht ein dringendes Interesse an tierversuchsvermeidenden Alternativen.

Erste Ansätze zur Reduktion von Tierversuchen erfolgten bereits im Jahr 1959 von den Forschern William Russel und Rex Burch (Reduce, Refine, Replace, 3R-Prinzip) (Russell and Burch, 1959). Dieses 3R-Prinzip soll durch die Reduzierung der Anzahl der Tests und der Einführung internationaler Standards zur Verringerung der Anzahl der eingesetzten Tiere führen (Reduction). Desweiteren sollen durch moderne Testverfahren und Analysenmethoden mehr Informationen aus weniger Experimenten gewonnen werden (Refinement). Letztendlich ist das schrittweise Ersetzen der Tierversuche durch äquivalente *in vitro*-Methoden gefordert (Replacement).

Bis zum heutigen Tag existieren von ECVAM validierte und regulativ akzeptierte *in vitro*-Ersatzmethoden, z.B. für den *Hautirritationstest (Draizetest)* sind die „*EPISKINTM und EPIDERMTM corrosivity tests*“ und für die Testung der akuten oralen Toxizität (LD₅₀-Methode) die „*Acute Toxic Class Method for acute oral toxicity testing (ATC-test)*“. Weitere etablierte wissenschaftlich akzeptierte Tierversuchsersatzmethoden sind der „*Embryonic Stem Cell Test (EST) for embryotoxicity*“, der „*Micromass (MM) embryotoxicity assay*“, der „*Whole Rat Embryo embryotoxicity assay*“ (<http://ecvam.jrc.it/>), sowie der „*Limulus-Amoebocyten-Test*“ (Pharmacopeia European 5, 2.6.14; FDA Guideline USP 29:2006 <85>).

Es gilt nun einen Kompromiss zwischen den widersprüchlichen Forderungen nach einer Ausweitung der sicherheitstoxikologischen Untersuchungen auf Basis von Tierversuchen und der gleichzeitigen Reduktion bzw. den Ersatz von Tierversuchen zu finden.

Dafür käme eine Kombination aus biologischem System und Mikrochipssystem in Frage, die in der Lage ist, das Wirkungsprofil von Substanzen mittels auf verschiedenen Mikrosensoren wachsenden Zellen bzw. Gewebeteilen *in vivo*-nah zu charakterisieren. Bereits in den 70er Jahren entstanden auf der Suche nach schnellen, kostengünstigen und platzsparenden Alternativen zu herkömmlichen Untersuchungssystemen sogenannte *Micro-Total-Analysis Systems (μTAS)*, die in späterer Zeit in modifizierter Form unter dem Begriff Lab-On-Chip Systeme (LOCs) zusammengefasst wurden (Terry et al., 1975; Reyes et al., 2002; Herold et al., 2009; Yeha et al., 2010). Diese Systeme skalieren die in herkömmlichen Laboren verwendeten Versuchsanordnungen auf den Mikromaßstab herab; z.B. Mikrochips mit integrierten elektrischen Sensoren. Dadurch werden auch Laboranalysen im Mikromaßstab ermöglicht. Die Größenbereiche dieser Systeme variierten im Bereich von Quadratmillimetern bis zu wenigen Quadratzentimetern und benötigen für die Analysen nur sehr kleine Volumina. Die am häufigsten verwendeten Chipsubstrate sind Glas (Fertig et al., 2002; Koester et al., 2010; Buehler et al., 2010; www.multichannelsystems.com) und Silizium (Müller et al., 1999, 2003; Krause et al., 2002, 2003; www.cytocentrals.com; www.bionas-discovery.com) sowie Polymere (Nambiar et al., 2011). Einzelne Systeme erlauben durch entsprechende Kombination den Ausbau zu „Multiparameter“-Systemen. Dies bedeutet, eine parallele systematische Erhebung und Auswertung großer Mengen von Messungen (z. B. BAS; Bionas-Adcon-Reader; <http://www.bionas-discovery.com>;

Cerioti et al., 2006; Roche-Xcelligence-Reader; <http://www.roche-applied-science.com/sis/xcelligence/ezhome.html>).

Ende der 80er, Anfang der 90er Jahre entstand neben den hauptsächlich im Bereich chemisch-physikalischer Messungen eingesetzten μ TAS, deren, für die Messungen mit zellulären Systemen modifizierte Varianten, die als LOCs bezeichnet wurden (Manz et al., 1990; Fuhr et al., 1997; Daridon et al., 2001; Vilkner et al., 2004). Um schnelle, kompakte und zelluläre Biosensorsysteme zu entwickeln, wurden Zellkultur- und Analysesysteme miteinander kombiniert (El-Ali et al., 2006; Wolf et al., 2006).

Parallel zu den Zellanalysesystemen wurden auch Anwendungen zur Zellmanipulation (Fuhr et al., 1996; Andersson et al., 2003; Medoro et al., 2003; Chiou et al., 2005; (<http://www.ibmt.fraunhofer.de/en/Fields-of-work/ibmt-cellular-biotechnology.html>) entwickelt, z.B. Patch-On-Chip Systeme zur on-line-Charakterisierung von zellphysiologischen Prozessen (Dunlop et al., 2001; Sigworth et al., 2002), zur Zellallokation mittels Dielektrophorese (Fuhr et al., 1996; Gimsa et al., 1996, 1998, 2001; Huang et al., 2002; Müller et al., 1993, 2000, 2003; Morgan et al., 1997; Suheiro et al., 1998), der Bestimmung von Membraneigenschaften von Zellen durch Elektrorotation (Fuhr et al., 1985; Gimsa et al., 1998, 1999; Wachner et al., 1999) und zur Elektroporation von Zellen (Fuhr et al., 1996; Sukhorukov et al., 1998; Khine et al., 2004; Fox et al., 2006; Kim et al., 2007; Maswiwat et al., 2008) sowie zum Positionieren von Zellen mittels des Zell-Trappings (Fuhr et al., 1998; Johann et al., 2006; Mokkapati et al., 2009) und des Transportierens polarisierbarer Medien mittels Travelling-Wave-Pumpenbetriebener Elektroden (Hagedorn et al., 1992; Talary et al., 1996; Morgan et al., 2001).

Der Einsatz von LOCs erlaubt u.a. zeitliche Änderungen physiologischer Daten in Abhängigkeit von zu testenden Wirkstoffen online aufzuzeichnen (www.bionas-discovery.com). Die in die μ TAS/LOCs integrierten Mikrosensoren sind in der Lage kleinste Veränderungen von Stoffwechselprodukten oder der elektrischen Aktivität von Zellen zu detektieren (www.multichannelsystems.com). Aufgrund der Sensitivität von Zellen ist es möglich mit sehr geringem Einsatz an Material (Zellen, Kulturmedien, Testsubstanzen) und damit geringeren Kosten, auswertbare Ergebnisse (z.B. bei Substanzscreenings) zu erzielen. Aufgrund dessen beschäftigen sich die Forschungsschwerpunkte des biomedizinisch-

analytischen Bereichs mit Zellkulturtestsyste men (Daridon et al., 2001; El-Ali et al., 2006) zur Detektion zellulärer metabolischer Parameter (Bousse et al., 1994; Bousse and Parce, 1994; Baumann et al., 2004; Kafi et al., 2011) und der elektro-physiologischen Aktivität (Gross et al., 1977, 1979, 1982, Tominaga et al., 2001; Dittrich et al., 2006; Wolf et al., 2006; Koester et al., 2010; Buehler et al., 2010).

Weitere Schwerpunkte der μ TAS-/LOC-Anwendungen sind in der klinischen Diagnostik (Horike et al., 2003; Balck et al., 2011), der Proteinanalyse und -separation (Ng et al., 2002) sowie der DNA-Analyse, -separation, -sequenzierung und Polymerase-Kettenreaktion (Woolley et al., 1996; Khandurina et al., 2000; Dunn et al., 2000; Duwensee et al., 2009; Auroux et al., 2002), den dielektrischen Eigenschaften von Zellen und biogenen Partikeln (Gimsa et al., 1991, 2001; Goater et al., 1997; Müller et al., 1999, 2000, 2003; Schnelle et al., 2000) sowie der technischen Optimierung von Mikropumpen (Stubbe et al., 2007, 2011; Debesset et al., 2002) zu finden.

Die zu *in vitro*-Zellkultur-Systemen auf- und ausgebauten LOCs erlauben eine neue Art der sowohl invasiven, z.B. Patch-On-Chip Systeme (Dunlop et al., 2008; Sigworth et al., 2002), als auch nicht-invasiven on-line Charakterisierung von Parametern zellphysiologischer Prozesse (Gross et al., 1977, 1979, 1982; Pine et al., 1982, Ehret et al., 2001; El-Ali et al., 2006; Wolf et al., 2006; Thedinga et al., 2007; Koester et al., 2010; Buehler et al., 2010, 2011, 2012a, 2012b).

Die Messung der zellulären Atmung (Clark-Typ-Elektroden, Ceriotti et al., 2007; Thedinga et al., 2007) und Ansäuerung (ionensensitive Feldeffekttransistoren (ISFETs), Matsuo et al., 1974; Baumann et al., 1999; Lehmann et al., 2001; Poghosian et al., 2009), das Adhäsionsverhalten von Zellen mit interdigitalen Elektrodenstrukturen (IDES) (Giaever and Keese, 1984, 1991, 1993; Ehret et al., 1997; Wolf et al., 1998) sowie der elektrophysiologischen Aktivität mit Multielektrodenarrays (MEA) (Gross et al., 1977, 1979, 1982; Pine et al., 1982; Gramowski et al., 2004; Dworak et al., 2009; Koester et al., 2010; Buehler et al., 2010, 2011, 2012a) ermöglichen Aussagen über den stoffwechselpysiologischen Gesamtzustand sowie über die Morphologie, das Proliferationsverhalten und den elektrophysiologischen Aktivitätszustand von Zellen und können anhand der in den Mikrochips integrierten Sensoren detektiert werden. Die Ableitung spontaner elektrischer Aktivität sowie der metabolischen Parameter erlaubt mittels redundanter Sensoren statistische orts- und zeitaufgelöste Darstellungen.

Die Untersuchung des Einflusses pharmazeutischer bzw. toxischer Substanzen auf das stoffwechselphysiologische Verhalten (Respiration, Ansäuerung und Adhäsion) von primären neuronalen Zellnetzwerken kann je nach Wirkort, Konzentration und Abbau des Wirkstoffes eine Änderung der Zellatmung bewirken (Clark et al., 1953; Cha et al., 1993; Brischwein et al., 2004). Eine Beeinflussung der H^+ -Ionen-Konzentration sowie die Beurteilung des Gesamtvitalitätszustandes der Zellen kann ebenfalls erfolgen (Ehret et al., 2001; Brischwein et al., 2004; Rebl et al., 2010). Eine Charakterisierung der Substanz und die Erstellung eines Dosis-Wirkungsprofils sind somit möglich.

Die Wirkungsweise von Substanzen auf neuronale Netzwerke kann unterschiedliche Auswirkungen haben. Zum Einen kann die Substanz gleichzeitig die stoffwechselphysiologischen Aktivitäten und die elektrische Aktivität beeinflussen, zum Anderen spezifisch auf die stoffwechselphysiologischen Aktivitäten oder spezifisch auf die elektrische Aktivität wirken. Im Falle der elektrischen Aktivität hat dies z.B. Veränderungen im neuronalen Aktivitätsmuster zur Folge (Keefer et al., 2001; Gramowski et al., 2004). Dies ermöglicht nach einer Analyse der ermittelten Daten eine Zuordnung der Substanz in eine bestimmte Wirkstoffklasse. Eine on-line Überwachung und die Detektion zeitabhängiger Änderungen in Abhängigkeit von zu testenden Wirkstoffen sind somit möglich geworden.

Etablierte „Mess-Systeme“ für die Untersuchung der elektrischen Aktivität (www.multichannelsystems.com, www.plexon.com, www.alphaomega-eng.com, www.med64.com, www.ayanda-biosys.com) sowie zur Messung stoffwechselspezifischer Parameter stehen bereits zur Verfügung (www.roche-applied-science.com; www.bionas-discovery.com).

Die Verwendung von LOCs zur Charakterisierung von Wirkstoffen setzt voraus, dass die eingesetzten Systeme in der Lage sind, über mehrere Größenordnungsbereiche in gleichbleibender Qualität messen zu können, da Wirkstoffeffekte sowohl bei sehr niedrigen als auch höheren Konzentrationen auftreten. Das Verhalten des Wirkstoffes ist konzentrationsabhängig und kann unterschiedliche Erscheinungsbilder haben (Hormese, Inhibition, Letalität). Nachfolgend wird auf diese Erscheinungsbilder näher eingegangen.

„Alle Dinge sind Gift und nichts ist ohne Gift. Allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist.“ Dieses bekannte Zitat stammt von dem spätmittelalterlichen Wissenschaftler Philippus Aureolus Theophrastus Paracelsus von Hohenheim

(1493-1541). Er verdeutlichte damit, dass, egal welcher Stoff vom Körper inkorporiert wird, sowohl heilende als auch letale Wirkungen hervorgerufen werden können. Wichtig dabei ist die aufgenommene Dosis, die Vorbelastung des Individuums mit dem entsprechenden Stoff sowie dessen gesundheitlicher Zustand.

Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Aussage von Paracelsus durch den Pharmakologen Hugo Paul Friedrich Schulz und den Psychiater Rudolf Arndt mit der Formulierung einer Richtlinie zur Reaktion des Körpers auf Reize (Arndt-Schulz-Gesetz, 1897) bestätigt: „Schwache Reize fachen die Lebenstätigkeit an, mittelstarke Reize fördern sie, starke hemmen sie, stärkste heben sie auf“. Das Arndt-Schulz-Gesetz wird oft zur Erklärung von Regulationstherapien (Homöopathie) herangezogen.

Aktuell werden solche stimulativen Effekte durch den Begriff Hormese erklärt (Calabrese et al., 1999, 2003, 2008). Der Begriff „Hormese“ wird für unterschiedliche stimulative Erscheinungsformen verwendet. Eine bekannte Tatsache ist, dass alle Organismen eine adaptive Überlebensstrategie verfolgen und dass es, z.B. bei der Zelle, durch Schadstoffe und deren Induktion von Entgiftungsmechanismen (z.B. das Multi Drug Resistance System, MDR-System) es zu einer Adaption an die Substanz(en) kommen kann. Es konnte mittlerweile festgestellt werden, dass je nach Zelltyp die Stoffwechselleistung adaptierter Zellen maximal 30 % bis 60 % höher sein kann als bei den entsprechenden Kontrollgruppen (Calabrese et al., 1999, 2003, 2008, 2010).

Ein gegenwärtig diskutiertes Thema ist z.B., ob niedrige Dosen ionisierender Strahlung einen positiven Effekt (Hormese) auf biologische Systeme haben können. In Bezug auf den menschlichen Organismus wird dabei von Strahlendosen <200 mSv (www.bfs.de/de/ion/wirkungen/Hormese.htm) gesprochen, die eine angeblich beschleunigende Wirkung von Wachstums- und Entwicklungsprozessen, die Anregung von Reparaturprozessen und eine Desensibilisierung gegenüber höheren Strahlendosen durch die Vorbestrahlung mit niedrigen Dosen (Konditionierung bzw. Adaptive Response) entwickeln. Mit Hormese werden auch Entzündungs- und Reizbestrahlungen bei gutartigen Erkrankungen sowie die Rheumabehandlung in Bergwerkstollen gerechtfertigt (Radonbalneologie). Die Begriffe "Hormese" und "Adaptive Response" werden oft gleichbedeutend verwendet (<http://www.bfs.de/de/ion/wirkungen/Hormese.htm>). Im indischen Kerala leben z.B. Menschen die einer vierfachen höheren natürlichen Radonbelastung ausgesetzt

sind als in Deutschland, bei denen jedoch die Häufigkeit von Krebserkrankungen im Durchschnitt bei gleicher Anzahl an Menschen geringer ist (Hendry et al., 2009).

Pharmakologische und toxikologische Untersuchungen mit LOCs dienen in *in vitro*-Experimenten neben der Bestimmung der Kinetik hauptsächlich der Ermittlung von IC_{50} -Werten. Dieser Wert gibt die halbmaximale Inhibition von z.B. Zellrezeptoren, Metabolismus, Wachstum, Proliferation, Migration usw.) durch einen Wirkstoff an. Im Gegensatz zu dem IC_{50} wird in den meisten Fällen von *in vivo*-Experimenten der LD_{50} -Wert ermittelt, d.h. die letale Dosis eines Wirkstoffs bei der 50% der eingesetzten Individuen nicht überleben. Die Referenzierung bzw. der Vergleich ermittelter IC_{50} -Werte mit den hauptsächlich in der Literatur zu findenden LD_{50} -Werten ist eigentlich nicht möglich, da in *in vitro*-Experimenten eine Reihe wichtiger Parameter (Bioverfügbarkeit, Verteilungsraum, Verteilungskoeffizient, Ausscheidung) noch nicht dargestellt werden können. Das entscheidende Kriterium für die Wirkung einer Substanz bei *in vitro*-Versuchen ist der IC_{50} -Wert.

Im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Verbundprojektes „Entwicklung prädiktiver *in vitro*-Tests zur sicherheitstoxikologischen Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität- (Developmental Neurotoxicity, (DNT) 31P4590)“ (Kaufmann et al., 2003; Grandjean et al., 2006) wurde in dem für den Lehrstuhl für Biophysik (LSfBP) bestimmten Teilprojekt die Etablierung von murinen embryonalen primären Cortexzellen (MEPC) sowie die Differenzierung von Zellen der murinen, embryonalen Stammzelllinie D3 (ES-D3-Stammzellen, Doetschmann et al., 1985) zu neuronalen Zellen (SNC) auf Glasneurochips (GNCs) und dem Metabolic-Chips SC 1000 (MCs) durchgeführt. Damit wurde die Ableitung neuronaler Signale und die Messung der metabolischen Parameter Respiration, Ansäuerung und Adhäsion (metabolische Parameter) ermöglicht. Es wurden die IC_{50} -Werte der spontanen elektrischen Aktivität sowie der metabolischen Parameter von MEPC und SNC unter dem Einfluss von Parathion und Natriumvalproinsäure (NaVPA) als bekannte neurotoxische und entwicklungsneurotoxische Substanzen, durch die Anwendung der MCs im BAS und der GNCs im Modularen Glas-Chip-System (MOGS) ermittelt. Die durch die Messungen erhaltenen *in vitro*-Daten wurden mit *in vivo*- und *in vitro*-Literaturdaten sowie mit den Ergebnissen der DNT-Projektpartner verglichen, um die Anwendbarkeit der entwickelten Methode zur Ermittlung von IC_{50} -Werten unter Verwendung von BAS,

MCs, MOGS und GNCs als potentielles Tierversuchersatzsystem im Rahmen des 3R-Prinzips zu überprüfen.

4. Material Methoden

4.1 Analysensysteme

4.1.1 Luminometer

Der „Lumistar-Plate-Reader“ (BMG LabTechnologies, Offenburg, Germany) ist ein kommerziell erwerbbarer Multiwellplattenreader zur Bestimmung lumineszierender und lumineszierbar gemachter Proben. In unseren Experimenten wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt von MEPC und SNC unter dem Einfluss von Parathion und NaVPA mit dem auf Lumineszenz basierenden „ATPlite Assay“ (ATPA) (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA) ermittelt. Die mit dem „Lumistar-Plate-Reader“ ermittelten Werte dienten zur Referenzierung der Ergebnisse der Messungen mit dem BAS und dem MOGS.

4.1.2 Bionas-Analyzing-System 2500 (BAS) und Metabolic-Chip SC 1000 (MC)

4.1.2.1 BAS

Das BAS mit den Metabolic-Chips SC 1000 (MCs) ist ein kommerziell erwerbbares Analysensystem (www.bionas-discovery.com) für die nicht-invasive, on-line Messung der Änderung der drei Stoffwechselfparameter Respiration, Ansäuerung und Adhäsion von Zellkulturen im Durchflusssystem. Der Zeitraum der Messungen ist variabel von Minuten bis zu Tagen. Dabei besteht die Möglichkeit, Signale von bis zu sechs MCs gleichzeitig zu registrieren. Das Pumpsystem ist intervallgeschaltet. Das in den Messungen verwendete Intervall wurde auf 4 min Pump- und 4 min Stoppphase programmiert (Empfehlung des Herstellers). Die Datenaufnahme der Parameter Respiration und Ansäuerung erfolgte ausschließlich, während der Stoppphase, so dass an den Sensoren keine Messwertverfälschung durch den Volumenstrom entstehen kann. Die Datenaufnahme der Adhäsion erfolgte kontinuierlich. Während der Pumpphase werden durch die Zellen verursachte Änderungen des O₂-Gehaltes und der H⁺-Ionenkonzentration im Medium ausgeglichen. Das System setzt sich im Wesentlichen aus vier Teilen zusammen: 1) Programmierbares Durchflusssystem, 2) Autosampler, 3) MCs und 4) Datenverarbeitungs- und Auswertungssoftware (www.bionas-discovery.com).

4.1.2.2 MC-Sensoren

Clark-Typ-Sensoren

Die in die MCs integrierten Clark-Typ-Sensoren detektieren den durch den aeroben Prozess der zellulären Energiegewinnung (ATP) verbrauchten Sauerstoff der Zellen amperometrisch.

ISFET

Die bei der aeroben ATP-Gewinnung anfallenden sauren Stoffwechselprodukte wie, z.B. CO_2 , das in wässriger Lösung HCO_3^- bzw. CO_3^{2-} bildet und das umliegende Zellkulturmedium durch die Zunahme der H^+ -Ionenkonzentration ansäuert pH-Wert-Änderung gemessen. Das bei einem anaeroben Prozess der zellulären Energiegewinnung entstehende Laktat ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3^-$) säuert ebenfalls das Zellkulturmedium an. Die Änderung der H^+ -Ionenkonzentration wird durch die ionensensitiven Feldeffekttransistoren (ISFETs) potentiometrisch detektiert.

IDES

Die Änderung der Morphologie, das Proliferations- und Migrations- sowie das Adhäsionsverhalten von Zellen kann unter Einfluss bestimmter Kulturbedingungen bzw. durch Zugabe und Wegnahme einer Substanz beeinflusst werden. Eine Änderung dieser Zellparameter wird z.B. als eine Änderung der elektrischen Kapazität zwischen den Elektroden einer interdigitalen Elektrodenstruktur (IDES) detektiert.

Für detailliertere Informationen zum BAS und den MCs siehe www.bionas-discovery.com und Buehler et al. (2011).

4.1.2.3 Alleinstellungsmerkmale des BAS

Gegenüber herkömmlichen Messmethoden bietet das BAS die Möglichkeit *in vitro*-Toxizitätsmessungen unterschiedlichster Substanzkategorien kontinuierlich, nicht-invasiv, on-line und *in vivo*-nah durchzuführen. Neben der Bestimmung von IC_{50} -Werten können z.B. Aussagen über die Art der Wirkung an den zu messenden Zellen, z.B. Reversibilität oder Hormese, einer Substanz getroffen werden (Buehler et al., 2011, 2012a) Diese Eigenschaften erlauben einen universellen Einsatz des BAS im Bereich toxikologischer, pharmakologischer Analytik, medizinisch bio-

logischer Grundlagenforschung sowie von z.B. Substanzscreenings im Rahmen von Ersatzmethoden zum Tierversuch.

4.1.3 Modulares Glaschipsystem (MOGS)

Das Modulare Glaschipsystem (MOGS, Koester et al., 2010) wurde im Rahmen eines vom Land Mecklenburg-Vorpommern prämierten Projektes (Venturesail 2007) zur Untersuchung der Toxizität von Substanzen an adhärent wachsenden Wirbeltier-Nervenzell-Netzwerken entwickelt.

Das MOGS setzt sich im Wesentlichen aus vier Teilen zusammen: 1) Glas-neurochip (GNC), 2) temperierbarer GNC-Sockel, 3) Ansteuerung mit Vorverstärker sowie 4) Datenerfassungs- und Verarbeitungseinheit Plexon (Plexon Inc., Dallas, Texas, USA) mit Auswertesoftware (Neuroexplorer, Offlinesorter; www.plexon.com/index.html).

4.1.3.1 GNC-Sensoren

MEA

Der GNC besteht aus einem Multi-Elektroden-Array (MEA) zur Erfassung der von neuronalen Zellen generierten elektrischen Signale, die über die MEA-Elektroden zum Vorverstärker und zur Plexon weitergeleitet und verarbeitet werden (Koester et al., 2010). Die Ansteuerung der integrierten Sensoren befindet sich in einem elektrisch geschirmten Aluminiumgehäuse mit einem runden, zentralen Durchbruch, um die Mikroskopierbarkeit während der Messung der elektrischen Netzwerkaktivität zu gewährleisten. Der Vorverstärker ist zur Schnittstelle eines kommerziellen Datenerfassungssystems (Plexon Inc., Dallas, TX, USA) kompatibel, welches die Messwerte digitalisiert, so dass die Auswertung mittels einer geeigneten Analysesoftware erfolgen kann (Plexon MEA-Server-Software).

IDES

Die Funktion des IDES ist in 4.1.2.2 beschrieben.

Temperatursensor

Der On-Chip-Temperatursensor (Pt1000-ähnlich) diente der Temperaturüberwachung während der Kultivierung und Messung der Zellen.

Weitere Elektroden

Weiterhin befinden sich auf beiden Seiten des MEAs zwei große Elektroden die sowohl als Masseelektroden als auch zur Zellstimulation verwendet werden können (Koester et al., 2010).

4.1.3.2 Alleinstellungsmerkmale des MOGS

Das MOGS bietet die Möglichkeit *in vitro*-Toxizitätsmessungen, insbesondere Neuro- und Entwicklungsneurotoxizität, nicht-invasiv und on-line durchzuführen. Neben der Bestimmung von IC₅₀-Werten können Aussagen über die Art der Wirkung, z.B. Reversibilität, Hormese und Entwicklungsneurotoxizität einer Substanz getroffen werden (Buehler et al., 2011, 2012a). Diese Eigenschaften erlauben einen Einsatz des MOGS im Bereich toxikologischer, neuro- und entwicklungsneurotoxikologischer und pharmakologischer Analytik, der medizinischen und biologischen Grundlagenforschung, sowie von Substanzscreenings im Rahmen von Ersatzmethoden zum Tierversuch.

4.2 Zellkultur

4.2.1 Medien für die Kultivierung und Messung mit Parathion

4.2.1.1 *Medium für die Aussaat von MEPC (SM)*

Das Aussaatmedium für MEPC (SM) besteht aus 77% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Phenolrot-Indikator, 10% fötalem bovines Serum (FBS), 10% Pferdeserum (ES), (0,5%) 100 U/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin und 1% L-Glutamin (200 mM) (Biochrom AG, Berlin, Germany) und 1% Methanol (Lösungsmittel für Parathion). Dieses SM ohne Methanol wird auch für Versuche mit NaVPA verwendet.

Alle Medien die für die Kultur und Messung von MEPC mit Parathion enthielten 1 % Methanol.

4.2.1.2 *Medium für die Kultur von MEPC (CM)*

Das Medium für die MEPC-Kultur (CM) besteht aus 87% DMEM mit Phenolrot-Indikator, 10% ES, (0,5%) 100 U/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin, 1% L-Glutamin (200 mM) (Biochrom AG, Berlin, Germany) und 1% Methanol (Lösungsmittel für Parathion). Dieses CM ohne Methanol wird auch für Versuche mit NaVPA verwendet. Weiterhin wurde CM für die Kultur von MEPC in MCs und den ATPA verwendet.

4.2.1.3 *Medium für die Messung von MEPC auf MCs im BAS (MM)*

Das Messmedium für die Messung von MEPC auf MCs im BAS bestand aus CM ohne NaHCO₃-Puffer und wird als MM bezeichnet.

4.2.1.4 *Parathionhaltige Medien für Aussaat, Kultur und Messung (SM+, CM+, MM+)*

Für die Messung der Wirkung von Parathion mit dem ATPA und dem BAS wurde eine 1:3 Parathion-Verdünnungsreihe aus einer 34.33 mM Parathion-Stocklösung in Methanol (10 mg/ml in Methanol; LGC Standards GmbH, Wesel, Germany) hergestellt. Die 34.33 mM Parathion-Stocklösung wurde 1:100 in SM, CM and MM verdünnt. Die daraus resultierenden Lösungen (343,3 µM Parathion) wurden wiederum 1:3 weiterverdünnt, so dass ein Konzentrationsreihe von 343,3 µM -1,41

μM entstand. Diese Konzentrationsreihe wurde für die Kultur und Messungen mit dem ATPA im Bereich von $343,3 \mu\text{M}$ - $1,41 \mu\text{M}$ und für Messungen im BAS im Bereich von $343,3 \mu\text{M}$ - $4,24 \mu\text{M}$ eingesetzt und als SM+, CM+ und MM+ bezeichnet.

4.2.1.5 Medium für den Abschluss der Messungen mit dem BAS (MMT)

Das Medium für den Abschluss der BAS-MEPC-Messungen und der gleichzeitigen Verifizierung des biologischen Ursprungs der Messdaten bestand aus 99% MM und 1% Triton X-100 (Sigma Aldrich Chemie GmbH P.O., Steinheim, Deutschland) und wurde als MMT bezeichnet.

4.2.2 Medien für die Kultivierung und Messung mit Natriumvalproinsäure

Die Medien für die Kultivierung und Messung von MEPC für die Experimente mit NaVPA entsprechen den Medien SM, CM und MM von Parathion ohne Methanol. Der Methanolanteil wurde durch DMEM ersetzt.

4.2.2.1 Medium für die Kultur von ES-D3-Stammzellen (EDCM)

Das Medium für die Kultur von ES-D3-Stammzellen besteht aus 81.5% DMEM mit Phenolrot-Indikator, 15% fötalem bovines Serum, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 1% L-Glutamin 2 mM, (0,5%) 100 U/ml Penizillin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 1% 10 mM Merkaptoethanol-Lösung (wässrige Lösung) (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland).

4.2.2.2 Medium für die Differenzierung von ES-D3-Stammzellen zu SNC (SCM)

Das Medium für die Kultur und Differenzierung von ES-D3-Stammzellen zu SNC bestand aus 49% NeuroPAN-Basalbasismedium, 0.5% PAN N2, 1.0% PAN B27, 48.8% PAN DMEM/F12 (PAN Biotec GmbH, Aidenbach, Deutschland) 0.1% Insulin, 0.1% Bovine Serumalbumin Fraktion V, (0,5%) 100 U/ml Penizillin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland).

4.2.2.3 Medium für die Messung von SNC im BAS (SMM)

Das Medium für die Messung von SNC bestand aus bestand aus SCM ohne NaHCO_3 -Puffer und wurde als SMM bezeichnet.

4.2.2.4 Medien für die Kultivierung und Messung von MEPC und SNC mit NaVPA

Für die Kultivierung und Messung der Wirkung von NaVPA mit dem ATPA und dem BAS wurde eine 1:3 NaVPA-Verdünnungsreihe aus einer 100 mM NaVPA-Lösung in SM, CM, MM, SCM und SMM (NaVPA: Sigma Aldrich Chemie GmbH P.O., Steinheim, Deutschland; Molare Masse: 166,2 g/mol; Einwaage: 1,662 g/100 ml) hergestellt. Aus dieser wurde eine Konzentrationsreihe im Bereich von 21,87 mM-0,09 mM durch entsprechendes Verdünnen in o.g. Medien hergestellt. Diese Konzentrationsreihe wurde für die Kultur und Messungen mit dem ATPA im Bereich 21,87 mM-0,09 μ M und für Messungen im BAS im Bereich von 21,87 mM-0,27 mM eingesetzt und als SM+, CM+, MM+, SCM+ und SMM+ bezeichnet.

4.2.2.5 Medium für den Abschluss der Messungen mit dem BAS (SMMT)

Das Medium für den Abschluss der BAS-SNC-Messungen und der gleichzeitigen Verifizierung des biologischen Ursprungs der Messdaten bestand aus 99% SMM und 1% Triton X-100 (Sigma Aldrich Chemie GmbH P.O., Steinheim, Deutschland) und wurde als SMMT bezeichnet.

4.2.3 Lösungen für die Reinigung und Beschichtung von Metabolic Chips SC 1000 (MC), 48-Well und Glasneurochips (GNCs)

Für die Kultur von MEPC und SNC auf MCs und GNCs, wurden diese in einem ersten Schritt mit 5%-iger Contrad-Lösung (Decon Laboratories Inc. PA, USA) gereinigt, mit einem 70% Ethanol/Wasser-Gemisch desinfiziert und im Anschluß mit PBS gespült (je 400 μ l (MCs) bzw. 200 μ l (GNCs) Füllvolumen). Die 48-Well-Platten waren steril verpackt und bedurften keiner Reinigung. Im Anschluß wurden zur Verbesserung der Zelladhäsion, die Chipoberflächen sowie die Wells der 48-Well-Platten mit 150 μ l (MCs, Wells) bzw. 50 μ l (GNCs) Poly-D-Lysin- (PDL, (Sigma Aldrich Chemie GmbH P.O., Steinheim, Deutschland) Lösung (100 μ g/ml) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen der überschüssigen PDL-Lösung erfolgte eine weitere Beschichtung mit 150 μ l (MCs) bzw. 50 μ l (GNCs) einer Laminin-Lösung (25 μ g/ml; Laminin Stocklösung 0,5 mg/ml, Roche, Penzberg, Deutschland) für zwei Stunden, die jedoch vor Aussaat der Zellen wieder entfernt wurde.

4.2.4 Primärzellgewinnung

Für die Primärzellkultur von MEPC wurde trächtigen NMRI-Mäuse (Charles River Laboratory, Sulzfeld, Deutschland) an Tag 16 nach der Befruchtung durch zervikale Dislokation getötet. Im Folgenden wurden die Embryonen in den Uteri unter sterilen Bedingungen entnommen, ebenfalls durch zervikale Dislokation getötet und deren frontaler Cortex präpariert. Die Zellen wurden nach enzymatischen Verdau (5 ml Papainlösung (61,25 mg/ml; Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 50 µl DNSase I (10^4 Units, Roche Applied Sciences, Penzberg, Deutschland), 15 min, 37 °C im Brutschrank (HeraCell 150 Thermo-Fisher-Scientific, Schwerte, Deutschland) in einer Einzelzellsuspension in SM zusammengefasst (Koester et al., 2010, Buehler et al., 2011). Die Aussaat erfolgte unmittelbar danach in SM/SM+. Ein Tag nach Aussaat wurde das SM/SM+ durch CM/CM+ ausgetauscht.

4.2.5 Monolayer-ES-D3-Stammzellkultivierung

Für die Differenzierung von ES-D3-Zellen (ZEBET, Berlin, Deutschland), zu SNC auf GNCs und MCs zur Messung der metabolischen Parameter und der elektrischen Aktivität musste zunächst für eine ausreichende Anzahl an ES-D3-Zellen gesorgt werden. Dafür wurden ES-D3-Zellen in zwei Phasen kultiviert. In Phase 1, der Vermehrungsphase wurden die ES-D3-Zellen aufgetaut (1×10^6 Zellen/ml), in EDCM ausgesät, kultiviert, durch Zugabe des Leukämie-inhibierenden Faktor (LIF; 10^6 Units, Chemicon, Hofheim, Deutschland) im pluripotenten Status gehalten (Williams et al., 1988) und in Zellkulturschalen soweit vermehrt, dass für die Versuche genügend ES-D3-Zellen zur Verfügung standen. Die Kultivierung und Inkubation der ES-D3-Zellen (und später auch der SNC) erfolgte im Brutschrank, pufferbedingt mit 5% CO₂ (MEPC-Kultivierung mit 10% CO₂) für insgesamt acht Tage, wobei an jedem zweiten Tag eine Passagierung der Zellen zu je $2,5 \times 10^5$ Zellen/Zellkulturschale durchgeführt wurde. Am siebten Tag wurde eine entsprechende Anzahl an Zellkulturschalen der gleichen Passagen zu je 2×10^6 Zellen zusammengefasst und für die folgende Phase 2, die Differenzierung der ES-D3-Zellen zu SNC auf GNCs und MCs in spezialisierte Zell- und Gewebetypen (z. B. Kardiomyozyten, Neurone, Fibroblasten (Fb)), aufkonzentriert.

4.2.6 Bestimmung der optimalen Zellzahlen

Aus den präparierten MEPC sowie aus differenzierungsbereiten ES-D3-Stammzellen (SNC) ohne LIF wurden mittels Neubauer-Zählkammer 1:2 Zellsus-

pensionsverdünnungsreihen in SM/SCM im Bereich von 4×10^6 Zellen bis $0,0625 \times 10^6$ Zellen/ml auf MCs und GNCs ausgesät und im Brutschrank (HeraCell 150, s.o.) in CM/SCM inkubiert (MEPC: 10% CO₂; SNC: 5% CO₂, 95% Luftfeuchte, 37°C). Die Kultivierungsdauer der ausgesäten Zellen (MEPC und SNC) in MCs, Wells und GNCs im Brutschrank betrug 12 *DIV*. Die besten Ergebnisse für das Überleben der Zellen, deren Differenzierung und die Bildung neuronaler Netzwerke konnte für eine Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml sowohl für MEPC als auch für SNC ermittelt werden. Bei Zellzahlen $>2,5 \times 10^5$ Zellen/ml waren das CM und das SCM in weniger als zwei *DIV* verbraucht und es war sehr viel totes Zellmaterial (Debris) feststellbar. Bei Zellzahlen $<2,5 \times 10^5$ Zellen/ml konnte teilweise ein Nicht-Anwachsen der MEPC/SNC, keine neuronale Netzbildung sowie ein verfrühtes Absterben der Zellen festgestellt werden.

In allen folgenden Versuchen wurden unabhängig der unterschiedlichen Kultivierungsvolumina (MCs; Plate-Wells: Je 400 µl, GNCs: 200 µl) je 1×10^5 Zellen verwendet.

4.2.7 Monolayer-ES-D3-Stammzelldifferenzierung

Der Beginn von Phase 2 (Stammzelldifferenzierung) erfolgte am achten Tag mit der Aussaat der ES-D3-Zellen in SCM/SCM+, analog der Aussaat der MEPC in SM/SM+, und der Wegnahme des LIFs in MCs und GNCs mit den entsprechenden Zellzahlen (s.o.). Eine weitere Inkubation für 12 *DIV* folgte, wobei an jedem zweiten Tag das SCM bzw. SCM+ komplett erneuert wurde. Sowohl auf MCs und GNCs konnten nach drei *DIV* GNCs erste EBs ausgebildet. Nach sechs *DIV* begannen diese die ersten neuronalen Zellen auszdifferenzieren (Feststellung mittels Lichtmikroskopie).

4.2.8 Hanging-Drop-(HD) ES-D3-Stammzellkultivierung und -differenzierung

Eine Alternative zur Monolayerdifferenzierung von ES-D3-Stammzellen auf MCs und GNCs zu SNC und murinen embryonalen stammzell-differenzierten cardialen Zellen (MESCC) ist das „Hanging-Drop- (HD) Verfahren (Wobus et al., 2001). Diese Art der Stammzellkultivierung kommt der *in vivo*-Entwicklung des lebenden Embryos am nächsten (Rudnicki et al., 1987). Der prinzipielle Aufbau eines EBs nach fünf Tagen Kultur im HD entspricht etwa dem Aufbau einer Blastozyste zum Zeitpunkt der Implantation in die Gebärmutterschleimhaut (Mensch: ca. sechs Tage nach der Befruchtung; Bradley et al., 1990).

Für die Bildung von HDs wurden ES-D3-Zellen an Tag acht der Kultivierung in EDCM im pluripotenten Status auf eine Zellzahl von 5×10^4 Zellen/ml eingestellt und in EDCM-Tropfen von jeweils 20 μ l auf die Innenseite der Deckel von Zellkulturschalen pipettiert. Im Anschluss wurden die Deckel gewendet und die ES-D3-Zellen begannen sich am unteren Rand des Tropfens zu sammeln und unmittelbar die EBs zu bilden.

4.2.9 Aussaat von Zellen mit Parathion und Natriumvalproinsäure (NaVPA)

Die Kulturvolumina in MCs, Wells und GNCs betrugen jeweils 400 μ l bzw. 200 μ l SM/CM/CM+ bzw. SCM/SCM+. Um die Zellen von Beginn an mit Parathion bzw. NaVPA in Kontakt zu bringen wurden die Zellzahlen in den Aussaatzellsuspensionen verdoppelt (5×10^5 MEPC/ES-D3-Stammzellen/ml, ebenso die 1:3 Parathion- und NaVPA-Verdünnungsreihen (0 - 686,6 μ M Parathion und 0 - 43,74 mM NaVPA). Je MC, Well und GNC wurden je 200 μ l bzw. 100 μ l SM+ /SCM+ der entsprechenden Konzentration vorgelegt und mit der entsprechenden Zellsuspension auf 400 μ l bzw. 200 μ l Kultivierungsvolumen aufgefüllt. Ein Tag nach Aussaat der Zellen erfolgte ein kompletter Austausch von SCM+ und SM+ wurde durch CM+ ersetzt. Die Versorgung mit den beiden Wirkstoffen erfolgte mit jedem Kulturmediaustausch alle zwei Tage bis DIV 12. Die Konzentration von CM+/SCM+ betrugen 0 - 343,3 μ M Parathion bzw. 0 - 21,87 mM NaVPA.

4.2.10 Anforderung an die Zellkultur und Medien in Metabolic Chips SC 1000 (MC) und Glasneurochips (GNCs)

Die Kultivierung und Messung von Zellen auf MCs und GNCs setzt neben der Biokompatibilität der Materialien, der Fähigkeit der Zellen auf den MC/GNC-Oberflächen zu adhären, der richtigen Zellzahl und der bestmöglichen Zusammensetzungen des Kultivierungsmediums auch die richtige Wahl des Mediums für ein interferenzfreies Messen voraus. Die normalerweise verwendeten Zellkultivierungsmedien enthalten zur Stabilisierung des pH-Wertes (7,2) das Bikarbonat/Karbonatpuffersystem. Dabei wird das Gleichgewicht zwischen Kohlensäure (H_2CO_3) und Kohlendioxid (CO_2) im Brutschrank durch die kontinuierliche Begasung mit CO_2 gewährleistet. Ein solches Kulturmedium konnte für die Messungen der spontanen elektrischen Aktivität und Zelladhäsion in den GNCs verwendet werden, da die H^+ -Ionenkonzentration nicht zu den dortigen Messparametern gehörte. Für Messungen mit den MCs musste jedoch ein Medium verwendet werden

das die H⁺-Ionenkonzentration nicht weg puffert. Eine durch die Zellen verursachte Ansäuerung wäre sonst nicht messbar gewesen, da durch den Puffer die H⁺-Ionenkonzentration konstant gehalten worden wäre.

Da die Kultivierung und Differenzierung von ES-D3-Zellen zu SNC nach einem Protokoll für die herkömmliche Brutschrankkultur erfolgte und das darin beschriebene Neurobasalmedium (NBM) der Fa. Invitrogen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland; INV-NBM) karbonatpufferhaltig war, wurde diese Protokoll für unsere Bedürfnisse modifiziert. Das karbonatpufferhaltige INV-NBM war ausschließlich für den Gebrauch in Brutschränken geeignet und musste gegen ein für die Messung notwendiges karbonatpufferfreies NBM ausgetauscht werden. Die Bereitstellung eines solchen NBMs war der Fa. Invitrogen GmbH zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Ein ähnliches jedoch karbonatpufferfreies NBM (NBM ohne NaHCO₃) als auch das für die Kultivierung unter Brutschrankbedingungen notwendige karbonatpufferhaltige (NBM mit NaHCO₃-Puffer) NBM wurde deshalb von der Fa. PAN Biotec GmbH, (PAN Biotec GmbH, Aidenbach, Deutschland) bezogen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden die Bestandteile der beiden NBMs der Hersteller PAN Biotec GmbH und Invitrogen GmbH gegeneinander ausgetestet.

4.3 Eingrenzung des Messbereichs von Parathion und Natriumvalproinsäure (NaVPA)

Zu einer groben Eingrenzung des Messbereichs (Range finding) für Parathion und NaVPA wurde die Veränderung des in DMEM enthaltenen Indikators Phenolrot in Gegenwart saurer Stoffwechselprodukte ausgenutzt. Dazu wurden in 48-Well-Platten (Greiner BioOne, Frickenhausen, Germany) MEPC und SNC für 12 DIV unter dem Einfluss der jeweiligen 1:10 Verdünnungsreihen (Parathion: 0,01 µM - 1000 µM; NaVPA: 0,001 mM - 100 mM) kultiviert. Der Konzentrationsbereich für Parathion wurde so gewählt, dass dieser den in extoxnet.orst.edu/pips//parthio.htm gegebenen LD₅₀-Bereich von Ratten (17.2-85.2 µM und Mäusen (6,9 µM-103,0 µM) umfasste. Da die angegebenen LD₅₀-Werte in mg/kg angegeben waren wurden diese aus Gründen der Vergleichbarkeit in µM/l (Parathion) und mM/l (NaVPA) umgerechnet. Dabei wurde ein Liter einem Kilogramm gleichgesetzt. Analog dazu wurde für NaVPA der Bereich bereits bekannter *in vitro*- und LD₅₀-Experimente ausgewählt (0,3 mM-5,6 mM; Löscher et al., 1984; Hauck et al., 1991; Sigma Aldrich Sicherheitsdatenblatt; Gross et al., 1995; Koester et al., 2010;

Vreugdenhil et al., 1998). Nach 12 *DIV* konnten die Übergänge von metabolisierenden (lebenden Zellen) zu nicht metabolisierenden Zellen (toten Zellen) anhand der Färbung des Phenolrot-Indikators in Abhängigkeit der von Konzentration bestimmt werden. Diese Eingrenzung des Messbereichs erlaubte eine Einsparung an MCs zur Bestimmung der IC_{50} -Werte der metabolischen Parameter von MEPC und SNC.

4.4 Bestimmung des IC_{50} des intrazellulären ATP-Gehaltes

Der ATPA (ATPlite-Assay, PerkinElmer Inc. Waltham, Ma, USA) wurde zur Detektion der metabolischen Aktivität der Zellen auf Basis von 48-Well-Platten sowie als Referenzmethode zur Bestimmung der metabolische Parameter herangezogen. Unter Verwendung der in der Eingrenzung der Messbereiche festgestellten Konzentrationsbereiche wurden 1:3 Verdünnungsreihen für Parathion (0 μ M - 343,3 μ M) und NaVPA (0 mM-21,87 mM) verwendet (12 Wells für Kontrollen und je 6 Wells je Parathion-/NaVPA-Konzentration um die entsprechenden IC_{50} -Werte für MEPC und SNC zu quantifizieren. Insgesamt je vier unabhängige Experimente durchgeführt.

4.5 Metabolic Chip SC 1000-Messungen

Die BAS-Messungen mit den MCs zur Bestimmung der IC_{50} -Werte für die metabolischen Parameter von MEPC erfolgte an *DIV* 12 nach deren Kultivierung im Brutschrank auf sechs MCs (Je ein Chip für die Kontrolle (0 μ M) und fünf für die Konzentrationen der 1:3 Verdünnungsreihen von Parathion (4.24 μ M - 343.3 μ M) und NaVPA (0.27 mM - 21.87 mM). Für die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und den Testsubstanzen sowie für die Beendigung der Messung wurden MM/MM+; SMM/SMM+; MMT/SMMT, $NaHCO_3$ -pufferfrei verwendet um eine Interaktion des Puffers mit H^+ -Ionen zu vermeiden. Diese pufferfreien Medien haben keinen Einfluss auf die parallele Datenaufnahme der Respiration und Adhäsion. Für jeden Messmedientyp (z.B. MM/MM+; SMM/SMM+; SMM/SMMT) standen je sechs automatisch ansteuerbare Vorratsbehälter zur Verfügung, die über ein definiertes Schlauchsystem (Länge: 190 cm und $\varnothing_{\text{Schlauch}}$: 1,02 mm) mit dem entsprechenden MC verbunden waren. Durch die Festlegung definierter Pumpraten konnte dadurch ein definiertes Messzeitprotokoll festgelegt werden. Dieses war in drei Abschnitte aufgeteilt: 1) Desinfektion, 2) Messung 3) Reinigung (siehe Tabelle 1). Der Desinfektionsschritt wurde in Dummy-Chips durchgeführt (MCs ohne Senso-

ren). Die Messung und die Reinigung erfolgten mit, bzw. in den zu messenden MCs. Die Datenaufnahme startete nach einer Adaptionphase (180 min) der Zellen an die pufferfreien MM+ und SMM+ und an das intervallgeschaltete Durchflußsystem. Die Pumprate eines jeden Pumpintervalls (4 min) betrug 1,68 ml/h. Die während des Messintervalls (4 min) verwendeten Messvolumina betrugen ca. 6 µl, das entspricht dem Volumen des Raumes zwischen Durchflußadapter und MC-Oberfläche. Während eines Pumpintervalls wurden ein Volumen von 224 µl der Messmedien zur Regenerierung der H⁺-Ionen- und der O₂-Konzentration ausgetauscht.

Nach der Adaptionphase erfolgte für 30 min die Messung unter dem Einfluss von MM+ und SMM+. Im Anschluß folgte für weitere 320 min eine Messung mit MM und SMM um eine evtl. Reversibilität der durch MM+ und SMM+ verursachten Effekte auf MEPC und SNC feststellen zu können. Den Abschluß der Messungen bildete die Applikation der lysierenden (Triton-X-100- haltige Messmedien) MMT und SMMT zur Überprüfung des biologischen Ursprungs der detektierten Daten.

Tabelle 1: Messprotokoll für die Ermittlung der IC_{50} -Werte der metabolischen Parameter von MEPC unter dem Einfluss von Parathion und NaVPA sowie SNC unter dem Einfluss von NaVPA mittels des BAS. Die Datenaufnahme erfolgte über den Zeitraum der MM+/SMM+ und MM/SMM Perioden (hervorgehoben).

Messzeitraum [min]	Lösung	Flussrate [ml/min]	Pump- volumen [ml]	Intervall- betrieb
Desinfektionsprogramm				
3	Ethanol/H ₂ O 70%	5.6	16.8	nein
10	Ethanol/H ₂ O 70%	0.056	0.56	nein
2	PBS	5.6	11.2	nein
2	MM+/SMM+	5.6	11.2	nein
Messprogramm				
180	MM+/SMM+	0.028	5.04	ja
30	MM+/SMM+	0.028	0.84	ja
290	MM/SMM	0.028	8.12	ja
30	MM/SMM	0.028	0.84	ja
120	MMT/SMMT	0.028	3.36	ja
Reinigungsprogramm				
5	H ₂ O	0.56	2.8	nein
5	Ethanol/H ₂ O 70%	5.6	28	nein
10	Ethanol/H ₂ O 70%	0.056	0.56	nein

4.5.1 Bezugswerte (Offset-Werte) der Sensoren

4.5.1.1 MCs

Die Standardblankwerte sind als elektronische Offset-Werte für alle mit den Sensoren ermittelten Daten zu betrachten und wurden zur Korrektur der mit MEPC und SNC ermittelten Daten verwendet. Die Mittelwerte der Standardblankwerte für MEPC wurden aus sieben Messpunkten der MMT-Periode von sechs mit PDL/Laminin beschichteten, unbewachsenen und mit 400 µl MM befüllten MCs (Clark-Typ-Sensoren: $0,12 \text{ pAs}^{-1} \pm 0,21 \text{ pAs}^{-1}$, ISFETs: $0,65 \text{ µVs}^{-1} \pm 1,17 \text{ µVs}^{-1}$, IDEs: $39,84 \text{ nF} \pm 1,04 \text{ nF}$) gebildet und uns von der Fa. Bionas zur Verfügung gestellt.

Für SNC hingegen wurden die zur Referenzierung nötigen Blankwerte für die metabolischen Parameter aus den letzten sieben Messpunkten der

SMMT-Perioden einer jeden Konzentration (0,27 mM - 21,87 mM NaVPA) aus den Einzelexperimenten gemittelt. Diese Mittelwerte stellten die Offset-Werte für die entsprechenden MCs dar und wurden als Blankwerte für die weitere Auswertung und Berechnung verwendet. Ein Vergleich der eigenen Offset-Werte mit denen durch die Fa. Bionas ermittelten Offset-Werte ist in (5.1.4, Tabelle 2) dargestellt.

4.5.1.2 GNCs

Die durchschnittlichen elektronische Offsetwerte für die MEA-Elektroden je GNC betrug $1,2 \mu\text{V} \pm 3,7 \mu\text{V}$. Dieser Werte wurden von PDL/Laminin beschichteten unbewachsenen und mit 200 μl CM befüllten GNCs ermittelt und von den Messwerten der generierten Aktionspotentiale für die weitere Auswertung subtrahiert. Der durchschnittliche elektronische Off-Set-Wert, die Kapazität eines mit PDL/Laminin beschichteten, unbewachsenen und mit 200 μl CM befüllten GNCs wurde ermittelt, und jeweils von den gemessenen Kapazitäten mit MEPC bewachsener GNCs subtrahiert.

4.5.2 Methode der Messdatenverarbeitung- und verifizierung

Die Auswertung und Statistik der Messdaten erfolgte mit handelsüblicher Software (MS EXCEL[®], Sigma Plot 11.0[®], Origin[®] 8.1G).

Die vom Hersteller empfohlene Verwendbarkeit der MCs unter Brutschrankbedingungen beträgt drei Tage bei dreimaliger Wiederverwendung, ohne dass es zu Sensorausfällen kommen sollte. Während unserer Messungen über diesen Zeitraum hinausgehende Kultivierungsdauer (>5 DIV) zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme von Sensordefekten. Diese waren entweder MC-Chargen-bedingt oder kamen durch mechanische Einwirkung beim Säubern, durch Feuchtigkeit und Testsubstanzen während der Kultivierung von MEPC und SNC oder durch eine Kombination der genannten Umstände zustande. Aus diesem Grunde wurden für die Auswertung der Messdaten nur MCs mit intakten Sensoren verwendet.

Zur Auswertung der Respirations- und Ansäuerungsmessdaten wurden die entsprechenden mittleren Standardblankwerte von den erhaltenen Messwerten der Kontrollen der unterschiedlichen Parathion- und NaVPA-Konzentrationen subtrahiert. Diese Daten wurden im Anschluss auf die Werte ihrer Kontrollen normalisiert (Kontrolle: 100%, Blank: 0%). Dieses Verfahren erlaubt unerwünschte Effekte, wie z.B. die Sensordrift, zu eliminieren.

Die Normalisierung der IDEs-Messdaten erfolgte auf die Kapazitätswerte des Blanks.

4.5.3 Fitgleichungen und Auswertung von Messdaten

Die Ermittlung der IC_{50} -Werte erfolgte durch Fitten an zwei logistische Gleichungen:

$$f_p = \text{Blk} + \frac{\text{Ktrl} - \text{Blk}}{1 + \left(\frac{c}{IC_{50}^I} \right)^{HS1}} \quad (1)$$

mit f_p : gefitteter Parameter; Blk : Konzentration des Blanks, $Ktrl$: Konzentration der Kontrolle (Die Konzentration der Kontrolle entspricht einer unendlich kleinen Parathion-/NaVPA-Konzentration); Parathion-/NaVPA-Konzentration in $\mu\text{M}/\text{mM}$; IC_{50}^I : IC_{50} von Parathion/NaVPA in $\mu\text{M}/\text{mM}$; entspricht 50% von f_p ; $HS1$: Hillslope. Die Normalisierung der Messwerte auf die Werte ihrer Kontrollen erlaubt eine vereinfachtere Darstellung dieser Werte ($Ktrl = 100\%$ und $Blk = 0\%$).

Während die mit Gleichung 1 gefitteten Kurven einen sigmoidalen Verlauf haben, zeigen die mit Gleichung 2 gefitteten Kurven einen doppelsigmoidalen Verlauf. Dieser wird bedingt durch den initialen Anstieg der Kurve in niedrigen Konzentrationsbereichen.

$$f_p = \text{Blk} + \frac{\text{Ktrl} + \text{Hm} - \text{Blk}}{1 + \left(\frac{c}{IC_{50}^{Gl.2}} \right)^{HS1}} + \frac{-\text{Hm}}{1 + \left(\frac{c}{IC_{50}^{Hm}} \right)^{HS2}} \quad (2)$$

Hm : Parameter für das Hormeseplateau (Das tatsächliche Hormeseplateau wird aus der Fitkurve von Gleichung 2 numerisch bestimmt; $IC_{50}^{Gl.2}$: Mit Gleichung 2 gefitteter IC_{50} von Parathion/NaVPA; IC_{50}^{Hm} : Mit Gleichung 2 gefitteter IC_{50} des hormesebildenden Anstiegs bei niedriger Parathion/NaVPA-Konzentrationen; $HS1$, $HS2$: Hillslopes für den Anstieg der Hormesefitkurve und den negativen Anstieg der IC_{50} -Wert-bildenden Fitkurve, mit den zwei experimentell ermittelten Parametern Hormeseplateau und IC_{50}^{Hm} .

Unter Verwendung von Gleichung 1 kann der IC_{50} -Wert direkt durch den Fit der Messwerte bestimmt werden. Dies ist mit Gleichung 2 nicht möglich, da das Maximum der gesamten Fitkurve in Gegenwart substanzinduzierter Hormese bei

mehr als 100% (Kontrollwert) zu finden sein kann. Dies bewirkt eine Verschiebung des IC_{50} -Wertes ($IC_{50}^{Gl.2}$) der damit nicht mehr den 50% des Maximums (IC_{50}^I) von Gleichung 1 entspricht.

Aus diesen Gründen wurde ein neuer Parameter eingeführt, der IC_{50}^{II} wobei $IC_{50}^{II} \neq IC_{50}^{Gl.2}$ ist. Der IC_{50}^{II} wurde durch das Ablesen des Wertes bei 50% des Kontrollwertes (100%) erhalten. Desweiteren wurde der IC_{50}^{Hm} als neuer Parameter eingeführt. Diesen zu charakterisieren ist eine zukünftige Aufgabenstellung, da die Untersuchung des Phänomens Hormese ursprünglich nicht Teil der Substanztestungen mit Parathion und NaVPA auf MEPC und war.

Der Parameter Hillslope, auch als Hill-Koeffizient bekannt, beschreibt die Steilheit der Fitkurven. In der Enzymkinetik (Michaelis-Menten-Kinetik) beschreibt der Hillslope die Anzahl der Ligandenbindungsstellen auf z.B. Proteinkomplexen.

Da die Anzahl der Bindungsstellen von Parathion nicht bekannt war, wurden verschiedene Hill slopes im Bereich von 0.5-3 für den Parameter HS2 in die Gleichungen 1 und 2 eingesetzt und getestet (Buehler et al., 2011). Die besten Ergebnisse wurden mit einem Hill slope von 2 erzielt und für den Parameter HS1 festgesetzt ($HS1 = HS2 = 2$) und für alle weiteren Auswertungen verwendet.

Im Gegensatz dazu wurde die Bestimmung des Hill slopes bei der Auswertung der Messdaten von NaVPA der Origin[®] 8.1G-Software überlassen, die den bestmöglichen Kurvenverlauf fittete. Der ermittelte Hill slope für den Parameter HS2 wurde wiederum für den Parameter HS1 festgesetzt ($HS1 = HS2$). Die Größe des HS2 war spezifisch für MEPC und SNC sowie für die einzelnen metabolischen Parameter und den intrazellulären ATP-Gehalt (Buehler et al., 2012a).

Die Messwerte potentieller Hormesekonzentrationen und den jeweiligen Kontrollen der ATP- und BAS-Messungen wurden einer Überprüfung auf Signifikanz (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test) unterzogen.

Während zum Zeitpunkt der Auswertung der Messdaten der Versuche mit Parathion die Überprüfung auf Signifikanz nur der Bestätigung einer vorliegenden hormetischen Konzentration diene, wurde das Auswertungsverfahren der Messdaten von NaVPA weiterentwickelt, indem in Gegenwart signifikanter Hormesekonzentrationen die Messdaten ausschließlich mit Gleichung 2 gefittet wurden. Diese Vorgehensweise verhindert die Bestimmung eines unpräzisen IC_{50} -Wertes in Gegenwart einer signifikanten Hormese durch die Verwendung einer herkömmlichen logistischen Gleichung (z.B. Gleichung 1). Signifikante hormetische Kon-

zentration sind als * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$), *** ($P \leq 0,001$) in den Abbildungen gekennzeichnet.

Für die Ermittlung der IC_{50} -Werte der mit den GNCs gemessenen elektrischen Aktivität und des Zelladhäsionsverhaltens von MEPC unter dem Einfluß von NaVPA wurde eine 4-parametrische standardlogistische Gleichung verwendet (Koester et al., 2010).

5. Ergebnisse

5.1 Bionas-Analyzing-System 2500 (BAS)

5.1.1 Elektrische Kontakte und Verbindungen

Während der Auswertung der mit dem BAS ermittelten Messdaten traten hardware-spezifische Besonderheiten auf, die sich bei der on-line-Überwachung der Messwerte in Form von Signalschwankungen und Signalverlusten bzw. Sensorausfällen zeigten. Eine Ursache waren Kontaktprobleme zwischen MC und MC-Sockel des BAS. Nach dem Einsetzen und Arretieren eines MCs im MC-Sockel erfolgte die Stabilisierungsphase für das Messsignal (Kapazität) der IDEs. Durch Polieren der Kontaktstellen desselben MCs und Einsprühen der Kontaktstellen des MC-Sockels mit Kontaktspray ergab sich eine höhere Stabilität für das Messsignal der Kapazität. Dieses unterschied sich teilweise deutlich von dem zuerst ermittelten Kapazitätswert. Der Hersteller hatte, um die Andruckkraft zu erhöhen zunächst Zwischenplatten konstruiert. Wir haben das Problem gelöst, indem grundsätzlich vor jeder Messung die Kontaktstellen eines jeden MCs als auch der MC-Sockel mittels Kontaktspray chemisch gereinigt wurden. Im Anschluss wurden die Messungen durchgeführt.

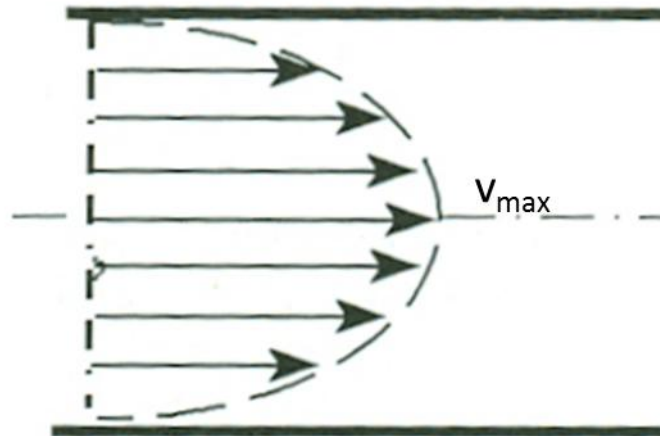
5.1.2 Sensoren

Bei der Auswertung ermittelter Rohdaten neuer MCs, die als Kontrolle während der Parathion-Messung dienten, wurden sowohl zwischen zwei Clark-Typ-Sensoren als auch zwischen den fünf ISFETs eines jeden Chips Sensitivitätsunterschiede festgestellt. Diese können einerseits von Fabrikationstoleranzen, andererseits von der Entfernung der Zellen zum Sensor und der Anzahl der Zellen in Sensornähe abhängen (persönliche Information der Bionas GmbH). Die von uns zum Zeitpunkt der Messung verwendeten MC-Chargen zeigten eine relativ hohe Ausfallrate an Sensoren (Buehler et al., 2011) was zum Einen auf die verhältnismäßig lange Kultivierungsdauer der MCs im Brutschrank und auf eine Alterung der Sensoren unter den gegebenen verschärften Kultivierungsbedingungen, zum Anderen tatsächlich auf fabrikationstechnische Gründe zurückzuführen war (z.B. fehlerhafte oder perforierte Verklebungsstellen zwischen Verkapselungsteil und Chip, was zur Zerstörung der Bondverbindungen führte).

5.1.3 Durchflusssystem

Die Versorgung der Zellen und die Wirkstoffapplikation in den MCs erfolgten extern über Schläuche des Fluidiksystems des BAS.

Ein Fluid ist beim laminaren Durchströmen des Schlauchsystems durch ein parabolisches Strömungsprofil charakterisiert (siehe Abb.1). Dies bedeutet, dass die Fließgeschwindigkeit des Fluids in der Mitte des Schlauches grösser ist, als an der Schlauchwand. Auf der Linie/Fläche des parabolischen Strömungskegels im Schlauchquerschnitt ist eine konstante Substanzkonzentration gegeben. Daraus folgt, dass die zum Zeitpunkt der Applikation vorliegende Konzentration einer Substanz unter Vernachlässigung der Diffusion nicht in derselben Konzentration über den gesamten Schlauchquerschnitt im MC bzw. bei den Zellen ankommt. Die Substanzkonzentration baut sich mit der Zeit (sigmoidaler Verlauf) auf bis die applizierte Konzentration erreicht wird. Eine solche Verteilung der Substanz ist von zusätzlichen Faktoren wie der Lipophilie bzw. Hydrophilie, Polarität, Polarität und Art des Lösungsmittels, Molekülgröße, Polarität des Schlauches, Diffusion, Schlauchradius und -länge (Danckwerts et al., 1953) usw. abhängig.



Quelle: Roland Glaser, Lehrbuch für Biophysik, 4. Auflage, Seite 210

Abb. 1: Modifizierte Darstellung des parabolischen Strömungsprofils eines Fluids am Beispiel eines Schlauchmodells mit maximaler Fluidgeschwindigkeit im Zentrum des Schlauches (V_{max}). Der Abbildung kann entnommen werden, dass ein strömendes Fluid unterschiedliche Strömungsgeschwindigkeiten aufweist. Im Zentrum des Schlauches wird die maximale Strömungsgeschwindigkeit erreicht während an den äußeren Schlauchrändern das Fluid durch Adhäsion gebremst wird ($V=0$ für benetzbare Oberfläche). Die viskosi-

tätsbasierte Kraftübertragung führt dann zu dem charakteristischen parabolischen Strömungskegel.

Die Überprüfung des zeitabhängigen Austausches von Fluiden im Schlauchsystem des BAS unter Berücksichtigung des parabolischen Strömungsprofils laminar strömender Fluide wurde anhand zweier unterschiedlicher pH-Lösungen (pH 10 und pH 4) und Pump-Modi (A) intervall- und B) kontinuierlich geschalteter Modus) vorgenommen (Abb. 2).

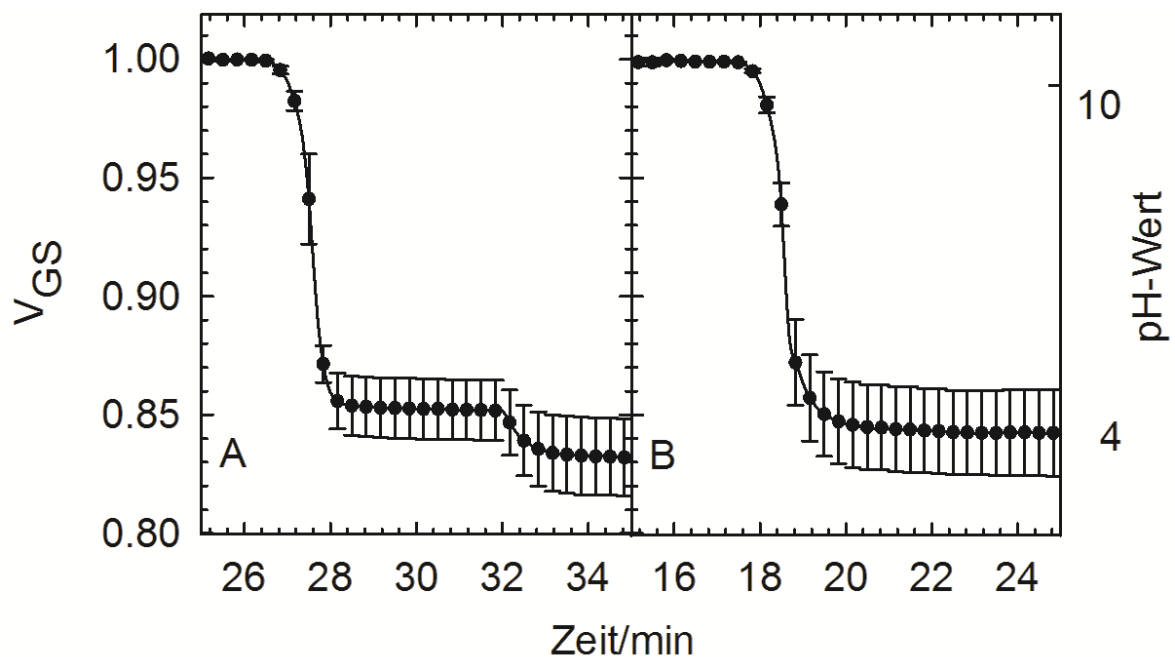


Abb. 2: Überprüfung des zeitabhängigen Austausches von Fluiden im Schlauchsystem des BAS unter Berücksichtigung des parabolischen Strömungsprofils laminar strömender Fluide. (A) Intervallgeschalteter Pumpmodus; B) Kontinuierlicher Pumpmodus. Die hier verwendete pH 10-Lösung entspricht einer Gate-Source-Spannung von $V_{GS} = 1\text{V}$. Zeitliche Änderungen der Spannung (linke Ordinate) und des pH-Wertes (rechte Ordinate) werden zur besseren Übersicht nebeneinander dargestellt.

A) Das intervallgeschaltete Pumpen (linke Bildhälfte) war charakterisiert durch eine 4-minütige Pump- und eine 4-minütige Mess- bzw. Stopphase. Der Start der Messung erfolgte mit einer pH 10-Lösung bei einer ISFET-Spannung von 1 V. Während der Pumpphase (bis zur 28. Minute) wurde die pH 10-Lösung durch eine pH 4-Lösung ausgetauscht, deren Erreichen an den Sensoren durch die Abnahme der Spannung bzw. des pH-Wertes angezeigt wird. Ab der 28. bis zur 32. Minute, während einer Stopphase, stellt sich eine Mischphase (Plateau, Bildmitte von A)

der beiden Lösungen ein (pH-Wert: ca. 4,2; ISFET-Spannung: ca. 0,86 V). Mit dem Einsetzen eines erneuten Pumpzyklus wurde die restliche pH 10-Lösung komplett verdrängt, erkennbar an einer weiteren Abnahme der Spannung (ISFET-Spannung: ca. 0,83 V; pH-Wert: ca. 3,9). Der Zeitraum eines Austausches der pH 10-Lösung durch eine pH 4-Lösung beträgt im intervallgeschalteten Pumpmodus ca. sieben Minuten. Die gemessene Spannungsdifferenz zwischen der pH 10-Lösung und der pH 4-Lösung betrug 0,17 V.

(B) Das kontinuierliche Pumpen war charakterisiert durch einen kontinuierlichen Austausch der pH 10-Lösung (1 V) durch die pH 4-Lösung ohne die Bildung einer Mischphase. Der Zeitraum des kompletten Austausches der pH 10-Lösung durch die pH 4-Lösung betrug ca. 4 min und die gemessene Spannungsdifferenz 0,16 V.

Um die beiden Messungen (intervallgeschalteter Austausch und kontinuierlicher Austausch der pH 10-Lösung) vergleichen zu können und den Einfluss unterschiedlicher Off-Sets der einzelnen Sensoren auf die Messdaten zu minimieren wurde ein mittlerer Plateauwert der pH 10-Lösung (bei pH 10 bzw. 1 V) aus sieben Messwerten ermittelt. Im Folgenden wurde jeder einzelne Sensorwert auf den mittleren Plateauwert seines Sensors normiert. Aus den erhaltenen normierten Messdaten wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt (*siehe Abb. 2*). Auffällig ist, dass bei der intervallgeschalteten Messung der endgültige pH-Wert (ca. pH 3,9) etwas niedriger ist, als bei der kontinuierlichen Messung (ca. pH 4) sich aber dennoch im Bereich von deren Standardabweichung befindet. Weiterhin ist eine Zunahme der Schwankungen der Messwerte mit abnehmendem pH-Wert beobachtbar.

Bei Betrachtung der Gesamtspannungsänderungen der ISFETs sowohl im intervallgeschalteten (0,17 V) als auch im kontinuierlichen (0,16 V) Pumpmodus fällt auf, dass die Beträge der Spannungsänderung je pH-Stufe mit durchschnittlich 0,024 V und 0,023 V nur 41 % bzw. 40% des in der Literatur angegebenen Wertes für das Potential einer idealen Glas-pH-Elektrode (0,059 V) bei Raumtemperatur, entsprechen (Hammann et al., 2005). Dieses Verhalten deutet daraufhin, dass sich auf den ISFETs eine Oxidschicht auf dem pH-sensitiven Siliziumnitrid- (Si_3N_4) Gate-Isolator gebildet hat. Dafür sprechen auch die in Baumann et al. (1996) beschriebenen pH-Empfindlichkeiten für Siliziumdioxid (SiO_2) als Gate-Material von ISFETs. Diese liegen durchschnittlich bei 0,031 V. Die hier ermittelten niedrigeren

Werte für die pH-Empfindlichkeiten könnten durch zusätzliche Verunreinigungen in der SiO₂-Oberflächenschicht bedingt sein.

Nichtsdestotrotz konnte die pH-Wertänderung von pH 10 auf pH 4 sowie die bei der Planung der Messzeiten zukünftiger Versuche mit dem BAS zu berücksichtigenden Zeiten für den Austausch von Fluiden mittels der MCs bestimmt werden.

5.1.4 Leerwertbetrachtung

Die Aufarbeitung der Sensormesswerte zur Ermittlung der IC₅₀-Werte erfolgte für MEPC wie in (4.5.1) beschrieben. Für die SNCs hingegen wurden die zur Referenzierung nötigen Blank-Werte für die metabolischen Parameter aus den letzten sieben Messpunkten der SMMT-Periode einer jeden Konzentration (0,27 - 21.87 mM NaVPA) aus den Einzelexperimenten gemittelt. Diese Mittelwerte stellten den Off-Set-Wert für die entsprechenden MCs dar und wurden als Blank-Werte für die weitere Auswertung und Berechnung verwendet. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, wurde ein Vergleich mit den von der Fa. Bionas GmbH zur Verfügung gestellten Blank-Werten durchgeführt (Tabelle 2). Die festgestellten Abweichungen der Blankwerte sind gegenüber den durchschnittlichen Messwerten der Kontrollen (durchschnittliches maximales Respirationssignal: 3,0 nA und durchschnittliches maximales Ansäuerungssignal: ca. 17 μ V/s) um das 10- bzw. 20-fache kleiner. Die Abweichungen der eigenen Messwerte für die Kapazitäten der IDEs gegenüber denen der Fa. Bionas betrug maximal ca. 21 %. Der durchschnittliche Betrag der Kapazitätsdifferenz der SNC-Kontrolle vor Messbeginn und nach der SMMT-Periode betrug $24,6 \pm 4,8$ nF (Fa. Bionas: $31,0 \pm 0,11$ nF). Die Abweichung und Streuung des ermittelten Betrages für die Kontrolle von SNC wird wahrscheinlich durch die Verwendung einer geringeren Anzahl an Messpunkten verursacht (siehe 3.5.1). Weitere Gründe könnten chargenbedingte Sensitivitätsunterschiede oder durch die Zellyse verursachte Verunreinigungen auf der IDEs sein. Diese Werte sind dennoch vergleichbar.

Tabelle 2: Ermittelte Standardblankwerte für MEPC und SNC für die metabolischen Parameter. Die Mittelwerte der Standardblankwerte für die MEPC wurden aus sieben Messpunkten von je sechs separat gemessenen, mit PDL/Lamin beschichteten MCs ohne Zellbewuchs gebildet (s.o.). Die Mittelwerte der Standardblankwerte für die SNC-Messungen wurden aus den letzten sieben Messpunkten der PMMT-Periode der jeweiligen NaVPA-Konzentration gebildet.

Blankwerte Ansäuerung						
MEPC, NaVPA (Bionas) [$\mu\text{V/s}$]	$0,65 \pm 1,17$					
NaVPA-Konzentration	Kontrolle	0,27 mM	0,81 mM	2,43 mM	7,29 mM	21,87 mM
SNC, NaVPA [$\mu\text{V/s}$]	$1,17 \pm 1,20$	$0,061 \pm 0,54$	$1,70 \pm 2,21$	$1,35 \pm 1,41$	$2,01 \pm 2,23$	$1,32 \pm 1,18$
Blankwerte Respiration						
MEPC, NaVPA (Bionas) [pA/s]	$0,12 \pm 0,21$					
NaVPA-Konzentration	Kontrolle	0,27 mM	0,81 mM	2,43 mM	7,29 mM	21,87 mM
SNC, NaVPA [pA/s]	$0,03 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,85$	$0,36 \pm 0,53$	$0,30 \pm 0,03$	$0,035 \pm 0,060$	$0,05 \pm 0,06$
Blankwerte Adhäsion						
MEPC, NaVPA (Bionas) [nF]	$39,84 \pm 1,04$					
NaVPA-Konzentration	Kontrolle	0,27 mM	0,81 mM	2,43 mM	7,29 mM	21,87 mM
SNC, NaVPA [nF]	$31,59 \pm 5,16$	$31,41 \pm 7,05$	$32,18 \pm 4,74$	$26,86 \pm 3,79$	$28,87 \pm 2,13$	$38,25 \pm 3,14$

5.2 Modulares Glaschipsystem (MOGS)

5.2.1 Signableitungsprobleme

Im Gegensatz zu den MCs traten Kontaktprobleme, zwischen Vorverstärker und GNCs nicht auf, da der Kontakt über gefederte Goldstifte zwischen Vorverstärker und GNC hergestellt wird (Koester et al., 2010). Allerdings ist eine Anfälligkeit der Goldfederkontaktstifte gegenüber salzhaltigen Lösungen gegeben. Überfüllung der GNC-Tröge, Vernachlässigung der Reinigung und Wartung von Kontakten und Goldfederstiften führen zur Korrosion der Stahlfedern innerhalb der Goldstifte.

Zur Testung der Ableitung der elektrischen Aktivität durch die von den MESCC (4.2.8) generierten Signale erfolgte analog der Durchführung der Mes-

sung der elektrischen Aktivität neuronaler Zellen (Koester et al., 2010). Leider konnten trotz visuell offensichtlicher Zellkontraktionen der MESCC keine Signale detektiert werden, obwohl die GNCs zuvor auf Funktionalität mittels Testsignal (1 mV) geprüft wurden. Die gebildeten MESCC wuchsen vermutlich auf einer isolierenden Schicht von Fb, die eine Messung der Zellsignale unmöglich machten. Um dieses Problem zu umgehen, könnte in zukünftigen Experimenten die MESCC-Differenzierung in Zellkulturschalen durchgeführt werden, um durch eine anschließende Zellseparation zu reineren MESCC zu gelangen. Diese könnten dann im Anschluss erneut zur Messung auf die GNCs ausgesät werden. Es konnte jedoch die erfolgreiche Gewinnung und Differenzierung zu SNC als auch MESCC auf den GNCs gezeigt werden.

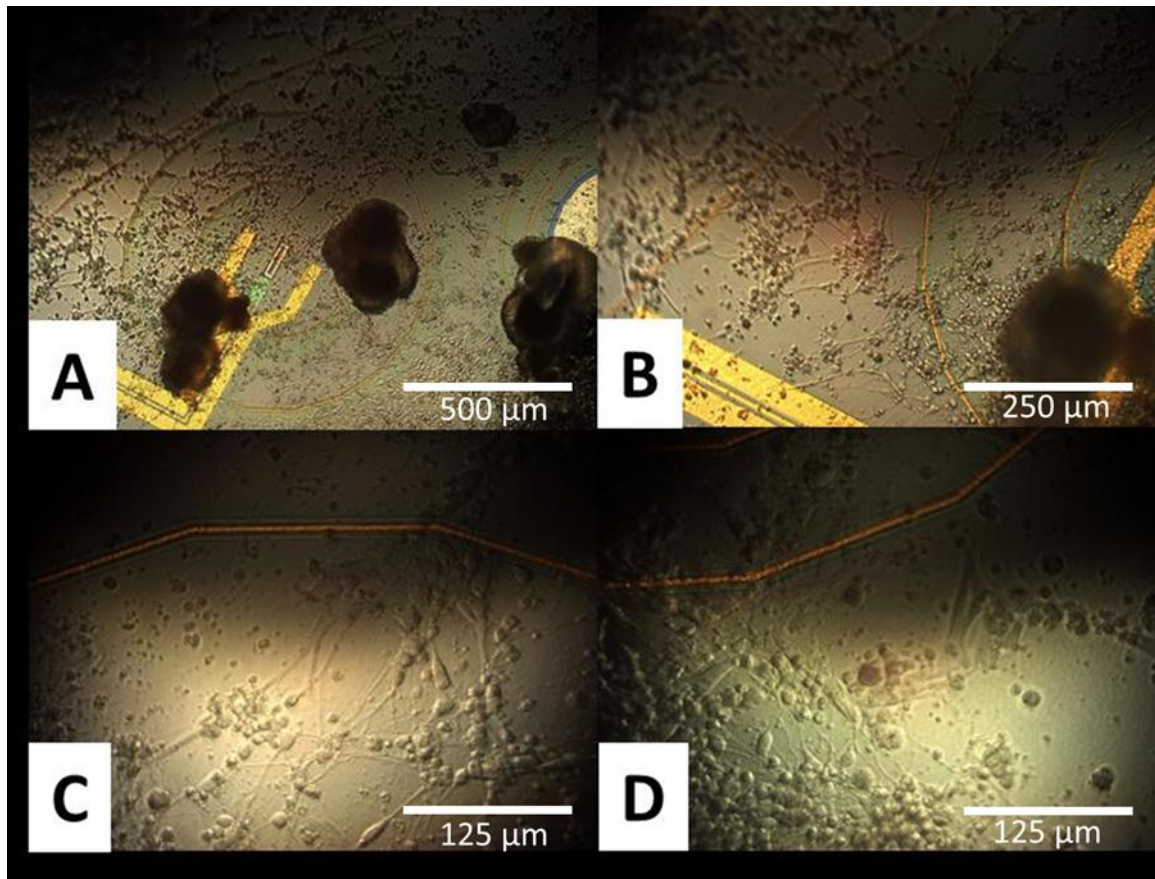
5.3 Zellkultur

5.3.1 Primärzellkultur

Die Kultivierung von MEPC auf MCs, Wells und GNCs konnte unter Verwendung der beschriebenen Präparier- und Kultivierungsverfahren für Primärzellen erfolgreich durchgeführt werden (Koester et al., 2010; Buehler et al., 2011).

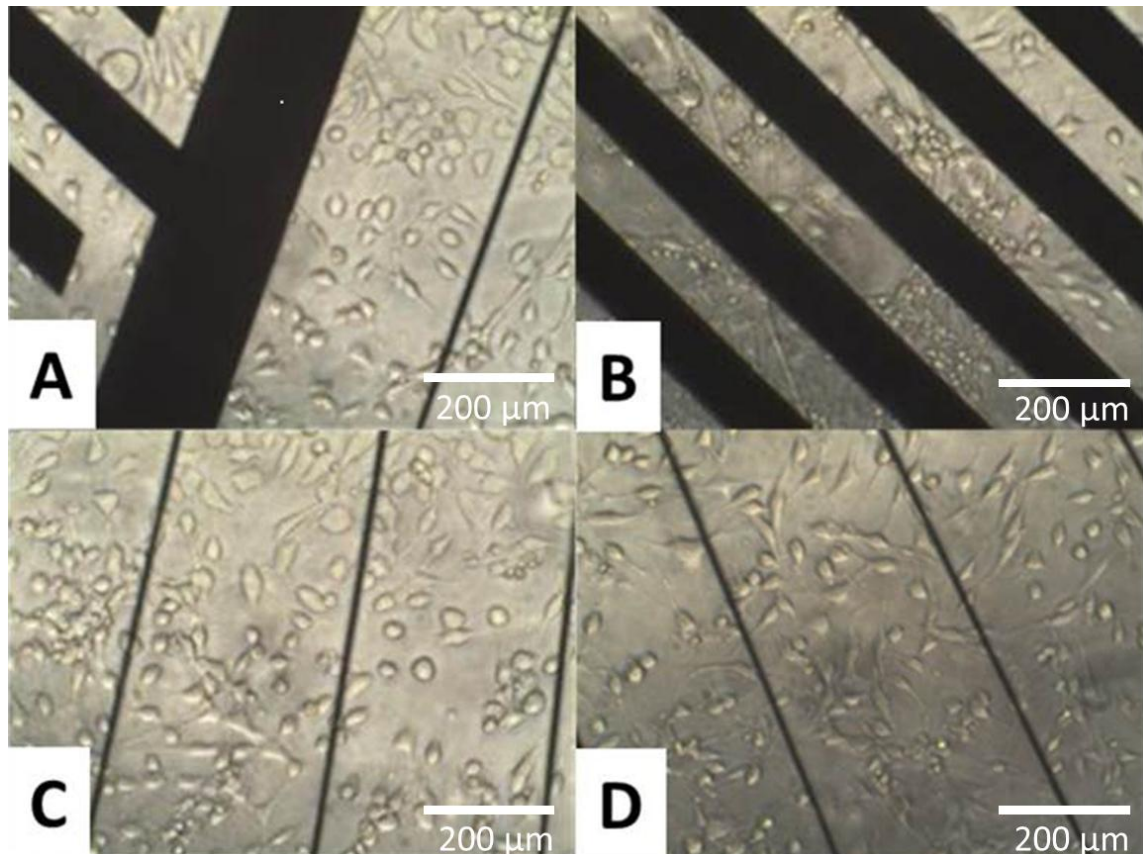
5.3.2 ES-D3-Stammzellkultur und -differenzierung

Die auf MCs und GNCs ausgesäten und adhärierten ES-D3-Zellen bildeten innerhalb der ersten drei *DIV* der Differenzierung EBs (dunkle Aggregate) aus, aus denen ersichtlich neuronalen Zellen differenzierten. Nach 12 *DIV* konnte mikroskopisch ein neuronales Netzwerk festgestellt werden (*Abbn. 3 A-D (MCs) und Abbn. 4 A-D (GNCs)*).



Abbn. 3 A-D: Aus ES-D3-Zellen differenzierte SNC nach direkter Aussaat der ES-D3-Zellen auf den MCs nach 12 DIV nach Differenzierungsbeginn. Das Wachstum und die Ausbreitung der SNC sowie die Formierung eines neuronalen Netzwerkes auf den nicht-passivierten Sensoroberflächen sowie auf den Si_3N_4 -passivierten Bereichen wurden nicht beeinträchtigt.

(A) Durchgehendes SNC-Wachstum auf passivierten Leiterbahnen und den nicht passivierten Sensoren (Clark-Typ-Sensor re. i. Bild). (B) Vergrößerte Darstellung von (A). (C, D) Vergrößerte Darstellung eines aus SNC gebildeten neuronalen Netzwerkes auf dem MC.



Abbn. 4 A-D: Aus ES-D3-Zellen differenzierte SNC nach direkter Aussaat auf den GNCs nach 12 DIV nach Differenzierungsbeginn. Das Wachstums und die Ausbreitung der SNC sowie die Formierung eines neuronalen Netzwerkes auf den nicht-passivierten Sensoroberflächen sowie auf den Si_3N_4 -passivierten Leiterbahnen und Elektroden (schwarz) wurde nicht beeinträchtigt. (A) Durchgehendes SNC-Wachstum auf und neben der nicht-passivierten IDES. (B) Durchgehendes SNC-Wachstum zwischen den 50 μm breiten IDES-Elektroden (schwarz). (C, D) Durchgehendes SNC-Wachstum auf, neben und über den 5 μm breiten, passivierten Leiterbahnen (schwarz).

5.3.3 Alternative ES-D3-Zellkultur und Differenzierung: Hanging-Drop-(HD-) Verfahren

Innerhalb eines Zeitraumes von 12 Stunden bildeten sich aus den ES-D3-Stammzellen EBs (Abb. 5 A, B). Nach zwei Tagen Kultur im HD wurden die EBs für weitere sieben Tage in eine Kulturschale mit EDCM überführt, die eine Adhäsion der EBs nicht erlaubte. Anschließend erfolgte die Aussaat auf den mit PDL/Laminin beschichteten GNCs. Unmittelbar nach der Adhäsion und Zugabe von SCM begannen die EBs umgehend in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren (Thomson 1998; Itskovitz-Eldor et al., 2000; Schuldiner et al., 2000). Eine Bildung von kontrahierenden MESCC aus den EBs (Wobus et al., 1991; Maltsev

et al., 1993; Wobus et al., 1997) konnte nach vier *DIV* und die Bildung von neuronalen Zellen nach sieben *DIV* festgestellt werden.

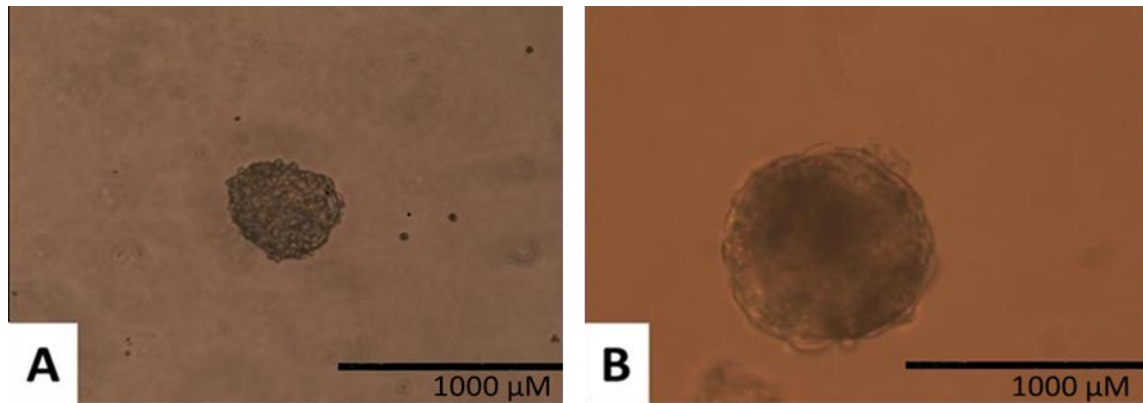


Abb. 5 A, B: Aus ca. 1000 ES-D3-Zellen gebildete EBs. A) EB, ein Tag nach Aussaat in EDCM und Kultivierung im HD. B) EB, sieben Tage nach Aussaat und Kultivierung in EDCM in einer Kulturschale mit nicht adhäsiver Oberfläche.

Die Differenzierung von ES-D3-Zellen nach dem HD-Verfahren bringt den Vorteil bereits differenzierte Zellen aller drei Keimblätter kompakt als EB verpackt aussäen zu können (Fleischmann et al., 2004). Erst die serumfreie Kultur sowie der Kontakt zur Oberfläche initiieren eine vermehrte Produktion differenzierter Zellen. Problematisch dabei ist die Positionierung der EBs in den MCs und GNCs. Wächst ein EB zu weit von einem Sensor z.B. MEA oder IDEs entfernt, ist es zeitlich nur schwer einschätzbar wann der Sensor von den aus den EBs migrierenden neuronalen oder cardialen Zellen überwachsen wird. Dies resultiert in inkonsistenten Wachstumszeiten, was zu unterschiedlichen Messzeitpunkten führen kann. Eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen wird dadurch schwierig bis unmöglich. Eine grobe Positionierung der EBs ist bis dato nur unter einer primitiven Vorgehensweise (Positionierung mit einer Pipettenspitze) durchführbar, die allerdings den EB gefährden kann. Diese Problematik ist bei der Monolayer-Differenzierung von der ES-D3-Zellen nicht gegeben. Hier kann eine Gleichverteilung der Zellen bei der Aussaat auf der Oberfläche der Chips erreicht werden.

Eine Lösung der Positionierungsfrage verspricht die Positionierung der EBs mittels Dielektrophorese (Fuhr et al., 1996; Gimsa et al., 1996, 1998, 2001; Huang et al., 2002; Müller et al., 1993, 2000, 2003; Morgan et al., 1997; Suheiro et al., 1998). Die dafür notwendigen Elektroden sind in den GNCs bereits vorhanden; dort jedoch noch nicht an der richtigen Position integriert. Die Voraussetzungen für

die Durchführung der Dielektrophorese in MCs, ist durch die Konzeption des BAS bzw. MCs noch nicht gegeben.

5.4 Austestung der Medien

Die Untersuchungen ergaben, dass das PAN-NBM mit NaHCO_3 in Kombination mit den Supplementen Neuropan 2 und Neuropan 27 der Fa. PAN, die gleichen Kriterien (Proliferation und Differenzierung, u.a. die Bildung von EBs) wie das Invitrogen-NBM in Kombination mit den Supplementen N2 und B27 der Fa. Invitrogen, erfüllte. Ein positiver Nebeneffekt war, dass sich bei der PAN-Medium/Supplementkombination ca. zehn, also durchschnittlich drei EBs mehr als bei der Invitrogen-Medium/Supplementkombination bildeten (Abb. 6).

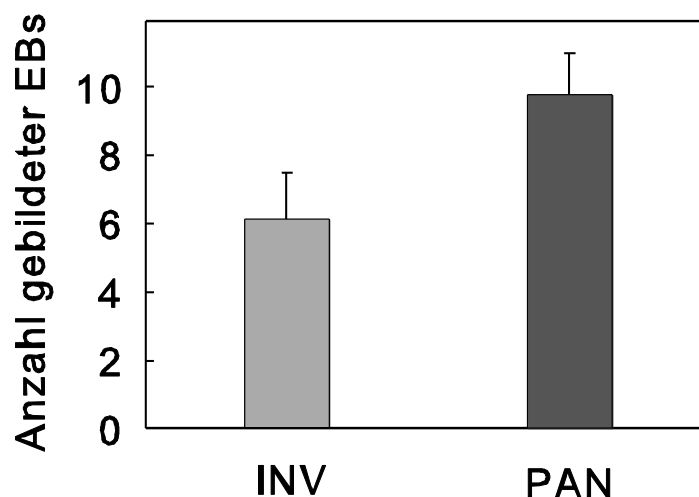


Abb. 6: Austestung der Medien und Supplemente; Invitrogen vs. PAN.

Darstellung der Anzahl der aus SNC gebildeten EBs mit je neun Experimenten für die Invitrogen- Medium/Supplementkombination (hellgrau) und die PAN- Medium/Supplementkombination (dunkelgrau), ausgezählt am DIV 5 nach Differenzierungsbeginn. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Die Signifikanz wurde anschließend mit dem T-Test ($P < 0,001$) bestätigt.

5.5 Einfluss von Parathion und Natriumvalproinsäure (NaVPA) auf neuronale Zellen

5.5.1 Testsubstanzset

Die von uns verwendeten Substanzen Parathion und NaVPA waren Teil eines Testsubstanzsets (siehe Tabelle 3), neurotoxischer und entwicklungsneurotoxischer Modellsubstanzen, das in Kooperation mit den Partnern eines BMBF-

Projektes (DNT-Projekt) bearbeitet wurde. Dabei handelt es sich um Substanzen aus den Kategorien: Pestizide (P), Medikamente (M), Lebensmittelzusatzstoffe (L), Industrieabfälle (I) sowie Bestandteil alltagsrelevanter Gegenstände (aG).

Tabelle 3: Substanzen des Testsubstanzsets des DNT-Projektes

Entwicklungsneurotoxische Substanzen	Toxische Substanzen
Methylquecksilberchlorid (I)	Parathion (P)
Chlorpyrifos (P)	Glutamat (L)
Methylazoxymethanolazetat (P)	Paracetamol (M)
Natriumvalproat (M)	-
Bleiazetat (aG)	-

Im Folgenden werden beispielhaft die Methoden der Bestimmung des Einflusses des Insektizides Parathion und des Antiepileptikums NaVPA auf die metabolischen Parameter, den intrazellulären ATP-Gehalt sowie auf die Generierung spontaner elektrischer Aktivität von MEPC und SNC dargestellt.

5.6 Parathion

Der Phosphorsäureester Parathion auch bekannt als E605 war ein in der europäischen Union (EU) in früheren Jahren sehr häufig eingesetztes Insektizid und Akarizid. Seit 2001 ist es im Gegensatz zu einigen asiatischen Ländern sowohl in der Schweiz als auch in der EU verboten. Nach Aufnahme in den menschlichen Körper wird das ungiftige Parathion im Rahmen der Biotransformation unter anderem zu Paraoxon oxidiert, dem mit Abstand potentesten humantoxischen Vertreter der Parathionmetaboliten (Jokanovic et al., 2001). Der primäre Wirkort von Paraoxon ist die Acetylcholinesterase, die den an den muskarinergen und nicotinergen Synapsen vorkommenden Transmitter Acetylcholin abbaut (Finkelstein et al., 1988). Dabei ist ein hydroxylierter Serinrest beteiligt, der die Karboxylgruppe des Acetylcholins abspaltet und den Transmitter so deaktiviert. Paraoxon bindet nun an die Hydroxylgruppe des Serins und verhindert damit den Abbau des Acetylcholins. Die dadurch induzierte Dauererregung an den Postsynapsen der motorischen Endplatten führt zu Verkrampfungen und letztendlichem Tod durch Atemstillstand. Bei rechtzeitiger Gabe von Oximen (Pralidoxim, Obidoxim) können die Symptome gelindert und ein tödlicher Ausgang der Vergiftung verhindert werden (Lüllman et al., 2010).

Ein weiterer Metabolit des Parathions, das p-Nitrophenol (H^+ -Shuttle), ist auch bekannt dafür die Elektronentransportkette der mitochondrialen Atmung zu inhibieren. Dies hat zur Folge, dass der Protonengradient über den Intermembranraum der Mitochondrien reduziert bzw. verhindert wird. Dieser Vorgang ist verbunden mit einer verminderten Bildung von ATP, was zu einer zellulären „Energiekrise“ führen kann (Jokanovic et al., 2001).

5.6.1 Messung der metabolischen Parameter mit dem Bionas-Analyzing-System 2500

Die Messung und Auswertung der ermittelten Daten für den intrazellulären ATP-Gehalt (Abb. 7) und der metabolischen Parameter von MEPC (Abbn. 8) unter dem Einfluss von Parathion erfolgte anhand der unter 3.2 beschriebenen Methode.

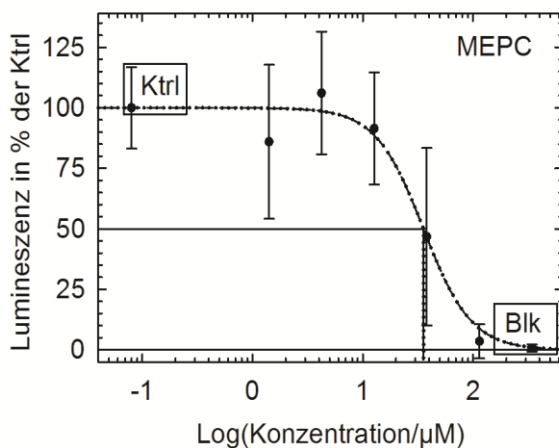
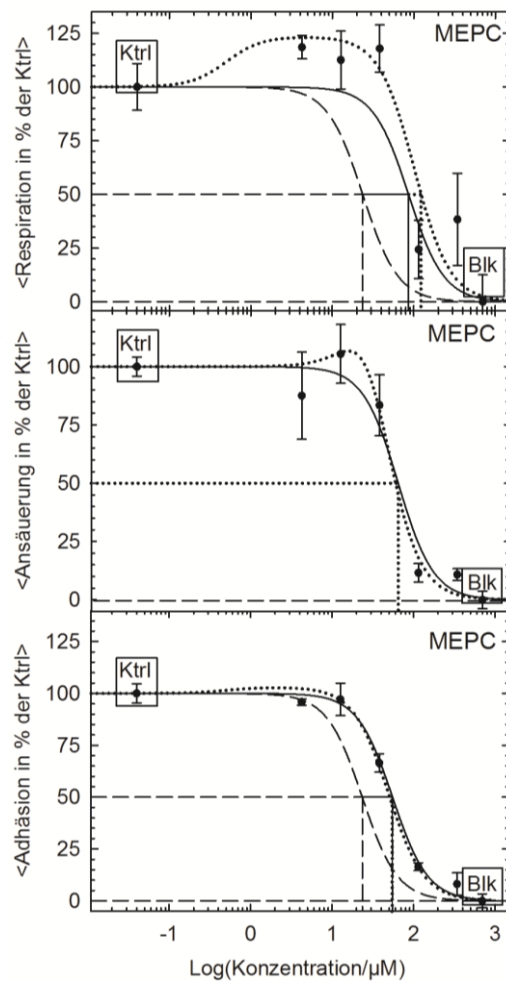


Abb. 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte des intrazellulären ATP-Gehaltes (ATPA) von MEPC nach 12 DIV unter dem Einfluss von Parathion (0 μM - 343,3 μM). Die Messwerte der einzelnen Konzentrationen wurden jeweils auf die Kontrollwerte normalisiert und gefittet. Die Mittelwerte der Kontrollen (Ktrl) und Blankwerte (Blk) wurden separat in Boxen dargestellt,

da sie sich nicht auf die Abszissenskalierung beziehen. Die ermittelten IC_{50}^I - und die bei 50% der Kontrolle abgelesenen IC_{50}^{II} -Werte (siehe Tabelle 4) liegen im Schnittpunkt der horizontalen und vertikalen durchgezogenen und gepunkteten Linien.



Abbn. 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte der Respirations-, Ansäuerungs-, und Adhäsionsraten von MEPC über den Zeitraum der MM+/MM-Periode (180-530 min). Die Messwerte der einzelnen Konzentrationen wurden jeweils auf die Kontrollwerte (100%) normalisiert und gefittet. Die Mittelwerte der Kontrollen (Ktrl) und Blankwerte (Blk) wurden separat in Boxen dargestellt, da sie sich nicht auf die Abszissenskalierung beziehen. Signifikante Hormesen konnten bei den Respirations- (4,23 μM , 38,07 μM Parathion mit $P \leq 0.001$) und Ansäuerungsmessungen (12,69 μM Parathion mit $P \leq 0.001$) ermittelt werden. Um den Unterschied zwischen den Fitkurven darzustellen, wurden die mittleren Raten sowohl mit Gleichung 1 (durchgezogene Linien) als auch mit Gleichung 2 (gepunktete Linien) gefittet. Zu ein-

em weiteren Vergleich wurde die mit Gleichung 1 ermittelte Fitkurve der Messwerte der ATP-Daten ebenfalls mit in die Abbildungen aufgenommen (unterbrochene Linien). Die ermittelten IC_{50}^I - und die bei 50% der Kontrolle abgelesenen IC_{50}^{II} -Werte liegen im Schnittpunkt der horizontalen und vertikalen durchgezogenen, gepunkteten und unterbrochenen Linien (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Vergleich der im DNT-Projekt ermittelten Ergebnisse aller Projektpartner für Parathion. Unterschiedliche Kultivierungszeiten führten zu unterschiedlichen Sensitivitäten der Zellen ge-

genüber Parathion und damit zu unterschiedlichen IC_{50} -Werten. Die ermittelten IC_{50} -Werte der Projektpartner (*) wurden in Pirow et al. (2009) ohne Streuung angegeben.

Projekt-partner	Endpunkt	Kult. + Diff. [DIV]; [h]	Zelltyp	Test	IC_{50}^I [μ M]	IC_{50}^{II} [μ M]	Hormese-Plateau [%]
LSfBP	ATP	12	MEPC	ATPA	35,49 \pm 3.20	35.54 \pm 3.60	-
	Respiration	12	MEPC	BAS	103,93 \pm 11.19	116.93 \pm 8.30	123,19
	Ansäuerung	12	MEPC	BAS	64,51 \pm 1.42	61.16 \pm 175.84	107,14
	Adhäsion	12	MEPC	BAS	54,61 \pm 0.39	52.45 \pm 0.47	-
	Elektr. Akt.	12/21	MEPC	MOGS	-	-	-
	Adhäsion	12/14/16	MEPC	MOGS	-	-	-
*ZEBET	Proliferation	14	3T3-Fb	CTBA	36,55	-	-
	Proliferation	14	SNC	CTBA	7,35	-	-
	Differenzierung	14	SNC	CTBA	21,45	-	-
*Proteo-Sys AG	EB-Bildung	4	hESC	V/D	21,30	-	-
	NP-Adhäsion	21	hESC	V/D	21,30	-	-
*IUF	Viabilität	7	hNPC	CTBA	180,00	-	-
	Migration	7	hNPC	V/D	n.e.*	-	-
	Differenzierung	7	hNPC	QIF	n.e.*	-	-
*TiHo	Differenzierung	4	NT2	IF/ β 3-Tub.c	29,20	-	-
	Differenzierung	4	NT2	IF/ β 3-Tub. F	44,87	-	-
	Differenzierung	4	NT2	DAPI	87,00	-	-
	Differenzierung	4	NT2	ABA	156,00	-	-
	Migration	24 h	NT2	V/D	-	-	-
	Migration	24 h	NT2	ABA	-	-	-
	Migration	48 h	NT2	ABA	-	-	-
	Migration	48 h	NT2	V/D	-	-	-

Legende: ZEBET: Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch; IUF: Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung gGmbH; TiHo: Tierärztliche Hochschule Hannover; ATP: intrazellulärer ATP-Gehalt; Elektr. Akt: Spontane elektrische Aktivität; EB-Bild.: Embryoidbodybildung; NP-Adh.: Neurosphärenadhäsion; Fb.: Fibroblasten; hESC: humane embryonale Stammzellen; hNPC: humane neuronale Progenitorzellen; NT2: humane Teratokarzinomazelllinie 2; QIF: Quantitative Immunfluoreszenz; IF: Immunfluoreszenz; ATPA: ATPlite Assay; ABA: Alamar Blue Assay; CTB: Cell Titer Blue Assay; V/D: Visuell/Distanz; β 3-Tub., DAPI: 4', 6-Diamidin-2-phenylindol.

Tabelle 5: Ermittelte in vitro- und in vivo-Grenzwerte für Parathion zur Referenzierung der im DNT-Projekt ermittelten IC_{50} -Werte. Es ist zu beachten, dass die in der Literatur ange-

gegebenen Werte ohne Berücksichtigung von *in vivo*-relevanten Parametern (siehe Abschnitt 6.2) nach dem in Buehler et al. (2011) angegebenen Schema in Molaritäten umgerechnet wurden.

Literatur	Versuchsobjekt	Grenzwert	Wert [µM]
Holz et al. (1959)	Maus (<i>in vivo</i>).	LD ₅₀	24,0
Sultatos et al. (1983)	Maus/Mikros./Paraoxon (<i>in vitro</i>).	K _m	29,6 ± 4,2
Sultatos et al. (1983)	Maus/Mikros./p-Nitrophenol (<i>in vitro</i>).	K _m	26,5 ± 3,8
Murray et al. (1994)	Maus/Mikros./Paraoxon, NADH-abh. (<i>in vitro</i>).	K _m	9,0 ± 1,0
	Maus/Mikros./Paraoxon, NaDPH-abh. (<i>in vitro</i>).	K _m	26,0 ± 6,0
	Maus/Mikros./p-Nitrophenol, NADH-abh. (<i>in vitro</i>).	K _m	18,0 ± 3,0
	Maus/Mikros./ p-Nitrophenol, NaDPH-abh. (<i>in vitro</i>).	K _m	53,0 ± 10,0
Exttoxnet	Ratte (<i>in vivo</i>).	LD ₅₀	6,9-103,3
Exttoxnet	Maus (<i>in vivo</i>).	LD ₅₀	17,2-85,2

Legende: halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit eines Substrates durch ein Enzym (K_m). Der K_m-Wert ist vergleichbar mit einem IC₅₀-Wert.

5.6.2 Zusammenfassung

Die zur Bestimmung des Einflusses von Parathion auf die metabolischen Parameter angewendete Methode zeigte nach der Applikation von parathionfreiem Messmedium (MM-Periode) (Buehler et al., 2011) sowohl keine signifikante Änderung als auch keine Annäherung der Messdaten an die Kontrollen. Ein reversibler Effekt bzgl. der drei metabolischen Parameter konnte somit im untersuchten Zeitbereich nicht festgestellt werden. Dieser Sachverhalt erlaubte die Messwerte für die metabolischen Parameter über den gesamten Messzeitraum (180-530 min) zu mitteln; d.h. die Mittelung aller während der MM+-, MM+/-MM- und MM- Perioden detektierten Messdaten (Abbn. 8). Aus diesen Daten wurden die für den Vergleich mit den Projektpartnern und Literaturwerten angegebenen IC₅₀-Werte (siehe Tabelle 4, Abbn. 8) ermittelt.

Desweiteren konnte bei den Messungen von MEPC mit dem BAS im Gegensatz zu den ATPA-Messungen eine signifikante Hormese bei niedrigen Parathionkonzentrationen festgestellt werden. Diese war signifikant bei den Parathionkonzentrationen 4,23 µM und 38,07 µM ($P \leq 0.001$) für die Respiationsleistung und bei 12.69 µM ($P \leq 0.001$) für die Ansäuerungsleistung.

Dieser Effekt war in den drei separaten Parathion-Messungen (BAS) reproduzierbar (Buehler et al., 2011). Um den Einfluss dieser Hormese auf die Bestim-

mung des IC_{50} zu untersuchen, wurde die logistische Standardgleichung zur Ermittlung des IC_{50}^I modifiziert und die Messgrösse IC_{50}^{II} eingeführt.

Die aus den Messdaten erhaltenen IC_{50}^I -, IC_{50}^{II} -Werte und Hormesen sind in Tabelle 4 angegeben. Ein Vergleich unserer IC_{50}^I - und IC_{50}^{II} -Werte mit den IC_{50} -Werten der Projektpartner zeigte, dass diese sich teilweise um Faktor 2 bis 3 unterscheiden. Gründe dafür sind unterschiedliche Messzeitpunkte und -verfahren (Lehrstuhl für Biophysik: Durchflusssystem, nicht invasiv; Projektpartner: invasiv), Zelltypen und Zellkultivierungsmethoden (siehe Tabelle 4).

Dennoch liegen alle ermittelten IC_{50}^I - und IC_{50}^{II} -Werte im Größenordnungsreich der Projektpartner und den in der Literatur zu findenden Grenzwerten (Tabelle 5) mit Ausnahme der von der TiHO und dem IUF ermittelten Endpunkte Differenzierung (156 μ M) und Viabilität (180 μ M).

5.7 Natriumvalproinsäure (NaVPA)

NaVPA ist ein antiepileptisches Medikament, welches u.a. die spannungsgesteuerten Natriumkanäle und T-Typ Kalziumkanäle hemmt (Kelly et al., 1990; McDonald et al., 1995). Weiterhin kann NaVPA beim Menschen neben schwerwiegenden teratogenen auch entwicklungsneurotoxische Effekte auslösen (z.B. Spina bifida). Desweiteren wurde festgestellt, dass NAVPA die Konzentration der Glutamatdecarboxylase (GDA) und γ -Aminobuttersäure-Konzentration (GABA) in den Synapsen von Mäusen erhöht (Gale et al., 1980; Löscher et al., 1981), was indirekt zu einer Dämpfung der neuronalen Aktivität von Cortexneuronen führt (Krnjevic et al., 1967). Na et al. (2003) stellten bei der Differenzierung der murinen embryonalen Stammzelllinie SCRC-1023 (ATTC SCRC-1023) zu Kardiomyozyten einen inhibierenden Effekt von NaVPA auf die Differenzierung fest. Diese Inhibition wurde mit einer auftretenden erhöhten Konzentration reaktiver oxidativer Spezies (ROS) in Verbindung gebracht, die in entsprechender Konzentration apoptotisch wirken. NaVPA ist weiterhin bekannt für die Inhibierung der β -Oxidation von Fettsäuren (Wallace et al., 2008; Pessayre et al., 2010; Schjøtt et al., 2011). Dadurch können die für die mitochondriale Energiegewinnung notwendigen Elektronen, die bei der Oxidation von Fettsäuren anfallen, nicht mehr auf NADH und NADPH übertragen werden. Die Folge ist eine Inhibierung des Komplex I der Elektronentransportkette mit der Reduzierung bzw. der letztendlichen Einstellung der

ATP-Produktion und damit dem Zelltod. Ein ähnliches Verhalten ist bei der Differenzierung von ES-D3-Zellen zu SNC zu vermuten.

5.7.1 Messung der spontanen elektrischen Aktivität und der metabolischen Parameter mit Glasneurochips (GNCs) und Metabolic Chips (MCs)

Die Ermittlung des Einflusses von NaVPA auf die spontane elektrische Aktivität und auf die Zelladhäsion von MEPC auf GNCs (Koester et al., 2010) sowie der metabolischen Parameter auf MCs erfolgte anhand der in 3.2 beschriebenen Methoden. Ein Vergleich aller für NaVPA ermittelten Ergebnisse ist in Tabelle 6 dargestellt.

5.7.2 Messung der elektrischen Aktivität mit dem Modularen Glaschipsystem (MOGS)

Die Messung der spontanen elektrischen Aktivität von Zellen erfolgte nach einer Inkubationszeit von 12 (MEPC12) bzw. 21 (MEPC21) *DIV* unter Einfluss einer NaVPA-Verdünnungsreihe (0-21,87 mM) mittels der mit neuronalen Zellen bewachsenen MEA-Elektroden (Koester et al., 2010). Während die MEPC12 eine elektrische Aktivität bei 0; 0,27 und 0,81 mM NaVPA aufzeigten, war diese bei den MEPC21 nur noch bei 0 und 0,27 mM NaVPA nachweisbar (*Abb. 9*). Zur Ermittlung der IC_{50} -Werte wurde die Anzahl der generierten Aktionspotentiale der MEPC unter Einfluss von NaVPA (0-21,87 mM) in Abhängigkeit der Kontrolle (Kontrolle=100%) bestimmt. Die anhand einer 4-parametrischen standardlogistischen Gleichung ermittelten IC_{50} -Werte für MEPC12 und MEPC21 sind in Tabelle 6 dargestellt.

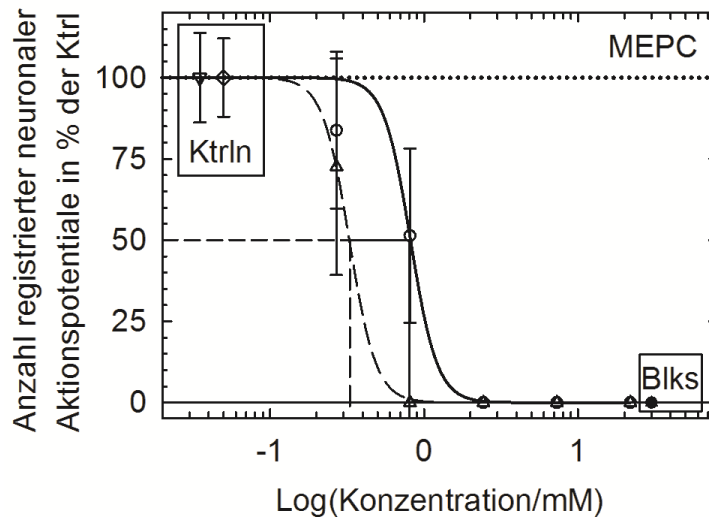
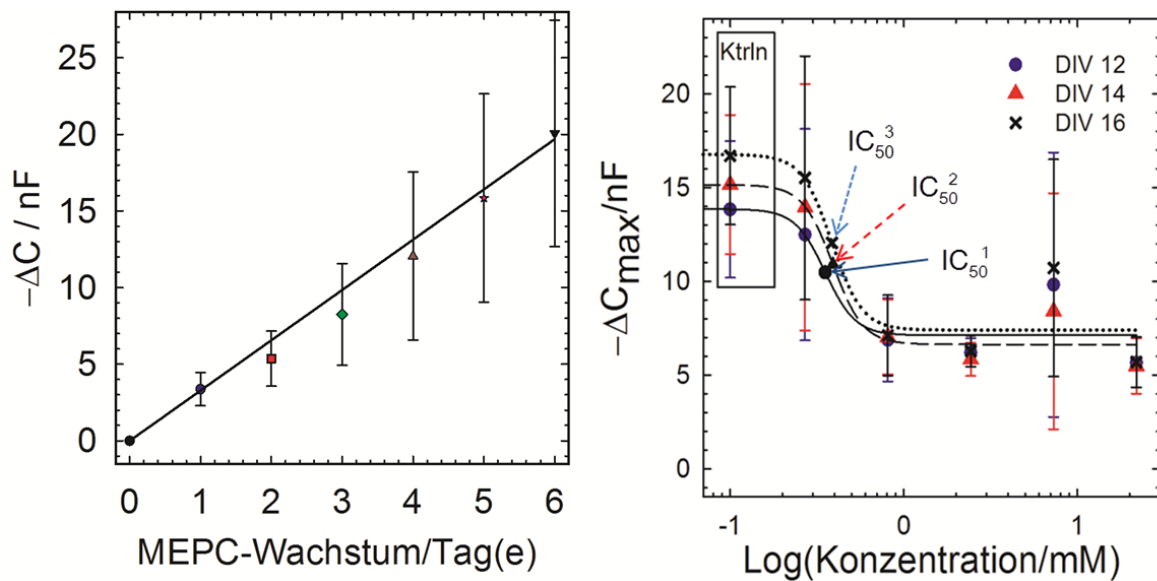


Abb.9: Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte der spontanen elektrischen Aktivität von MEPC12 (Dreiecke) und MEPC21 (Punkte) unter Einfluss einer NaVPA-Konzentrationsreihe (0 mM - 21,87 mM). Die Messwerte der einzelnen Konzentrationen wurden jeweils auf die Kontrollwerte normalisiert und gefittet. Die Mittelwerte der Kontrollen (Ktrl, Dreieck und Rhombus) und Blankwerte (Blks) wurden separat in Boxen dargestellt da sie sich nicht auf die Abszissenskalierung beziehen. Die ermittelten IC_{50} - (siehe Tabelle 6) liegen im Schnittpunkt der horizontalen und vertikalen durchgezogenen und unterbrochenen Linien. Die lange gepunktete und die lange horizontal verlaufenden durchgezogene Linien verdeutlichen 100% (Ktrl bzw. 0% (Blks) Aktionspotentialgenerierung.

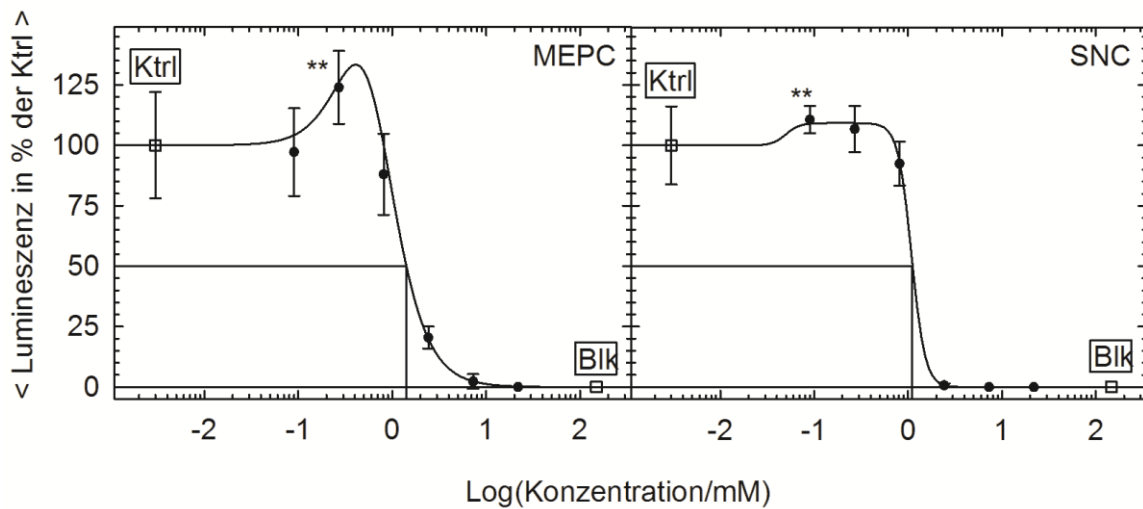
5.7.3 Messung der Zelladhäsion mit dem Modularen Glaschip System (MOGS)

Parallel zur Ermittlung der elektrischen Aktivität erfolgte die Ermittlung des IC_{50} für den Adhäsionszustand der MEPC anhand des IDES des GNCs (Koester et al., 2010). Zur Referenzierung der Daten wurde die Kapazitätsdifferenz (ΔC) von unbewachsenen mit PDL/Laminin beschichteten GNCs sowie derselben jedoch mit MEPC bewachsenen, täglich über einen Zeitraum von sechs DIV bestimmt. Die erhaltenen ΔC -Werte dienten als Kontrollwerte. Die Messung des Adhäsionsverhaltens von MEPC unter dem Einfluss von NaVPA erfolgte nach 12, 14 und 16 DIV (Abbn. 10). Die erhaltenen Messdaten wurden normalisiert und mittels einer 4-parametrischen standardlogistischen Gleichung gefittet um die IC_{50} -Werte zu ermitteln (siehe Tabelle 6).

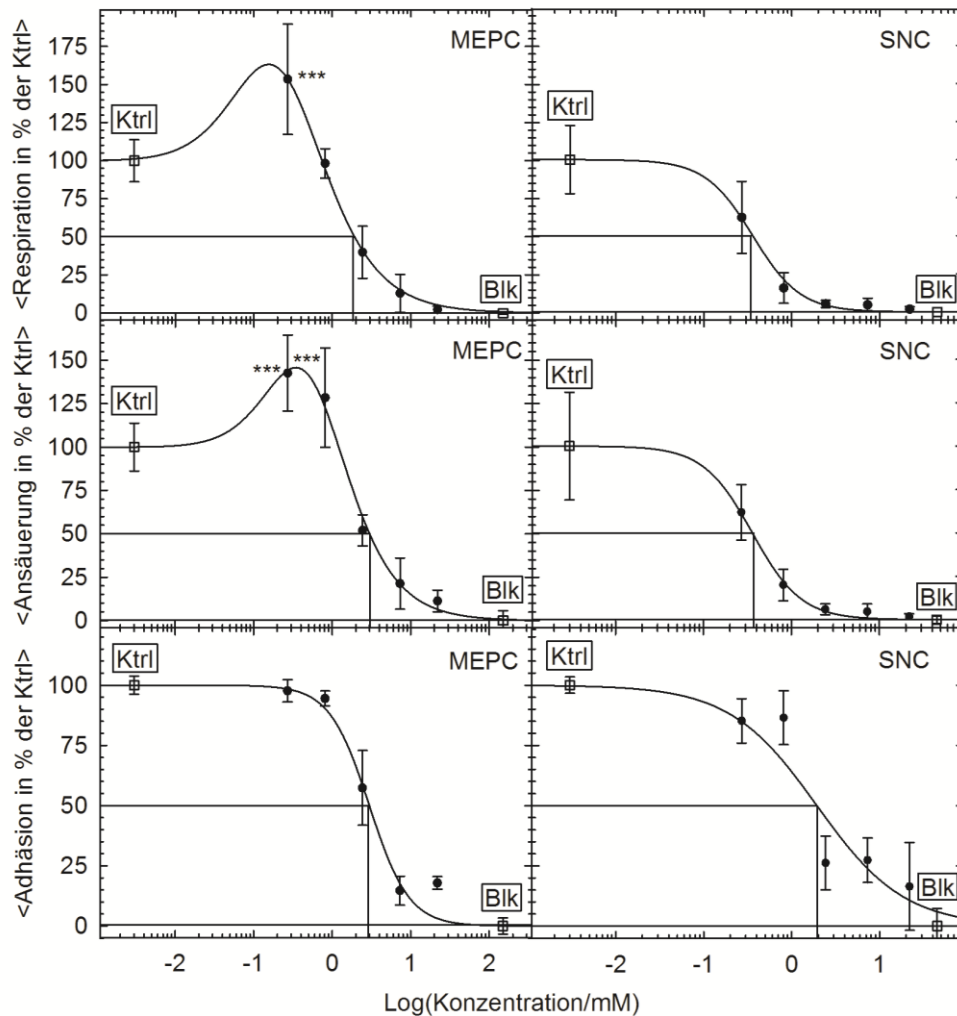


Abbn.10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte des Wachstums von MEPC auf einem GNC über einen Zeitraum von sechs DIV (Linkes Bild). Die Messungen des Wachstums erfolgten täglich mit der IDES eines GNCs der gleichzeitig als Kontrolle für die Messungen des Wachstums von MEPC unter dem Einfluss von NaVPA diente. Rechtes Bild: Darstellung der Mittelwerte der IDES-Messwerte mit Standardabweichungen des Zellwachstums von MEPC 12, 14 und 16 DIV unter dem Einfluss einer NaVPA-Verdünnungsreihe (0,27 mM - 21,87 mM). Je Konzentration wurden drei GNCs verwendet. Die Messwerte der einzelnen Konzentrationen wurden jeweils auf die Kontrollwerte bezogen und mittels einer 4-parametrischen standardlogistischen Gleichung gefittet. Die Mittelwerte der Kontrollen (Ktrl) und Blankwerte (Blk) wurden separat in Boxen dargestellt, da sie sich nicht auf die Abszissenskalierung beziehen. Die ermittelten 3 IC₅₀-Werte wurden den Tagen der Ermittlung entsprechend durch farbige Pfeile gekennzeichnet.

5.7.4 Zusammenfassung und Vergleich aller Messungen mit Natriumvalproinsäure



Abbn. 11: Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte des intrazellulären ATP-Gehaltes (ATPA) von MEPC und SNC nach 12 DIV unter dem Einfluß von NaVPA (0 mM - 21,87 mM). Die Messwerte der einzelnen Konzentrationen wurden jeweils auf die Kontrollwerte normalisiert und aufgrund vorhandener signifikanter Hormesekonzentrationen mit Gleichung 2 gefittet. Die Mittelwerte der Kontrollen (Ktrl) und Blankwerte (Blk) wurden separat als transparent quadratisch dargestellt und als solche in separaten Boxen gekennzeichnet, da sie sich nicht auf die Abszissenskalierung beziehen. Der Schnittpunkt der vertikalen und horizontalen durchgezogenen Linien zeigen den IC_{50}^{II} - Wert an (siehe Tabelle 6). Signifikante Hormesekonzentrationen konnten sowohl bei MEPC (0,27 mM mit $P \leq 0,01$) als auch bei SNC (0,09 mM NaVPA mit $P \leq 0,01$) festgestellt werden und sind in den Abbildungen durch Sterne (**) gekennzeichnet.



Abbn. 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte der Respirations-, Ansäuerungs-, und Adhäsionsraten von MEPC und SNC über den Zeitraum der MM+/MM-Periode (180-530 min). Die Messwerte der einzelnen Konzentrationen wurden jeweils auf die Kontrollwerte (100%) normalisiert und gefittet. Die Mittelwerte der Kontrollen (Ktrl) und Blankwerte (Blk) wurden separat als transparent quadratisch dargestellt und als solche in separaten Boxen gekennzeichnet, da sie sich nicht auf die Abszissenskalierung beziehen. Signifikante Hormesekonzentrationen konnten bei der Respiration- (0,27 mM NaVPA mit $P \leq 0,001$) und Ansäuerung (0,27 mM und 0,81 mM NaVPA, jeweils mit $P \leq 0,001$) ermittelt werden. Die IC_{50}^I - und die bei 50% der Kontrolle abgelesenen IC_{50}^{II} -Werte liegen im Schnittpunkt der horizontalen und vertikalen durchgezogenen Linien (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Vergleich der im DNT-Projekt ermittelten Ergebnisse aller Projektpartner für NaVPA. Unterschiedliche Kultivierungszeiten führten zu unterschiedlichen Sensitivitäten der Zellen gegenüber NaVPA und damit zu unterschiedlichen IC_{50} -Werten. Die ermittelten IC_{50} -Werte der Projektpartner (*) wurden in Pirow et al. (2009) ohne Streuung angegeben und so übernommen. Beim Auftreten signifikanter Hormesekonzentrationen wurden ausschließlich IC_{50}^{II} -Werte ermittelt.

Projekt-partner	Endpunkt	Kult. + Diff. [DIV]; [h]	Zelltyp	Test	IC_{50}^I [mM]	IC_{50}^{II} [mM]	Hormese-Plateau [%]
LSfBP	ATP	12	MEPC	ATPA	-	1,38 ± 4,89	133,7
	Respiration	12	MEPC	BAS	-	1,87 ± 2,91	161,2
	Ansäuerung	12	MEPC	BAS	-	2,97 ± 1,06	143,6
	Adhäsion	12	MEPC	BAS	2,98 ± 0,05	-	-
	Adhäsion	12/14/16	MEPC	MOGS	0,35-0,39	-	-
	Elektr. Akt.	12/21	MEPC	MOGS	0,76/0,33	-	-
	ATP	12	SNC	ATPA	1,09 ± 0,20	1,28 ± 0,09	114,8
	Respiration	12	SNC	BAS	0,34 ± 0,01	-	-
	Ansäuerung	12	SNC	BAS	0,36 ± 0,01	-	-
	Adhäsion	12	SNC	BAS	1,91 ± 0,06	-	-
	Elektr. Akt.	12/21	SNC	MOGS	-	-	-
ZEBET	Proliferation	14	3T3-Fb	CTBA	0,440	-	-
	Proliferation	14	SNC	CTBA	0,520	-	-
	Differenzierung	4	SNC	CTBA	0,022	-	-
Proteo-Sys AG	EB- Bildung	21	hESC	V/D	0,002	-	-
	NP-Adhäsion	7	hESC	V/D	1,310	-	-
IUF	Viabilität	7	hNPC	CTBA	4,660	-	-
	Migration	7	hNPC	V/D	0,880	-	-
	Differenzierung	4	hNPC	QIF	0,310	-	-
TiHo	Differenzierung	4	NT2	IF/β3-Tub.c	0,300	-	-
	Differenzierung	4	NT2	IF/β3-Tub.f	2,010	-	-
	Differenzierung	4	NT2	DAPI	1,900	-	-
	Differenzierung	24 h	NT2	ABA	0,200	-	-
	Migration	24 h	NT2	V/D	0,020	-	-
	Migration	48 h	NT2	ABA	0,010	-	-
	Migration	48 h	NT2	ABA	0,010	-	-
	Migration	48 h	NT2	V/D	0,010	-	-

Legende: ZEBET: Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch; IUF: Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung gGmbH; TiHo: Tierärztliche Hochschule Hannover; ATP: intrazellulärer ATP-Gehalt;

Elektr. Akt: Spontane elektrische Aktivität; EB-Bild.: Embryoidbodybildung; NP-Adh.: Neurosphärenadhäsion; Fb.: Fibroblasten; hESC: humane embryonale Stammzellen; hNPC: humane neuronale Progenitorzellen; NT2: humane Teratokarzinomazelllinie 2; QIF: Quantitative Immunfluoreszenz; IF: Immunfluoreszenz; ATPA: ATPlite Assay; ABA: Alamar Blue Assay; CTB: Cell Titer Blue Assay; V/D: Visuell/Distanz; β 3-Tub., DAPI: 4', 6-Diamidin-2-phenylindol.

Die bereits bei der Bestimmung des Einflusses von Parathion auf die metabolischen Parameter von MEPC verwendete Methode (4.2) wurde ebenfalls zur Bestimmung des Einflusses von NaVPA für die o.g. metabolischen Parameter von MEPC und SNC verwendet. Sowohl bei MEPC als auch bei SNC zeigte sich bei allen Parametern keine signifikante Änderung bzw. eine Annäherung der Messdaten in Richtung der Kontrollwerte nach der Applikation von NaVPA-freiem Messmedium (MM-Periode) (Buehler et al., 2012a). Ein reversibler Effekt bezüglich der drei metabolischen Parameter konnte daher nicht festgestellt werden. Dieser Sachverhalt erlaubte es uns die Messwerte für die metabolischen Parameter über den gesamten Messzeitraum (180-530 min) zu mitteln; d.h. die Mittelung aller während der MM+/SMM+- und MM/SMM-Perioden detektierten Messdaten. Aus diesen Daten wurden die IC_{50} -Werte für den Vergleich mit den Projektpartnern und Literaturwerten ermittelt (*siehe Tabelle 6*).

Desweiteren konnten bei allen Messungen mit dem ATPA und dem BAS sowohl für MEPC als auch für SNC signifikante Hormesen bei niedrigen NaVPA-Konzentrationen festgestellt werden (*siehe Tabelle 7*). Für SNC lag die ermittelte Hormesekonzentration für den intrazellulären ATP-Gehalt jedoch außerhalb der für die Messungen der metabolischen Parameter festgelegten Konzentrationsreihe (0,27 mM - 21,87 mM). Dies lässt vermuten, dass sich der Bereich von Hormesen für den intrazellulären ATP-Gehalt bei $\leq 0,09$ mM befindet. Dies bedeutet, dass SNC bzgl. dieses Parameters sensitiver sind als MEPC.

Die Auswertung der BAS-Messdaten für die metabolischen Parameter zur Ermittlung der IC_{50}^I -, IC_{50}^{II} -Werte und Hormesen erfolgte mit Ausnahme der Bestimmung der MC-Leerwerte für SNC und die strikte Anwendung von Gleichung 2 für die Ermittlung von IC_{50} -Werten bei signifikanten Hormesekonzentrationen analog zu Parathion.

Tabelle 7: NaVPA-Konzentrationen mit signifikanter Hormese (intrazellulärer ATP-Gehalt, Respiration und Ansäuerung) bei MEPC und SNC. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney Rank-Sum-Test ($P=0,05$) bestimmt.

Signifikanz der Hormesen bestimmter NAVPA-Konzentrationen			
Parameter	NaVPA- Konzentration [mM]	MEPC	SNC
ATP	0.09	-	$P=0.01$
	0.27	$P=0.01$	-
(180-530 min)			
Respiration	0.27	$P \leq 0.001$	-
	0.81	-	-
Ansäuerung	0.27	$P < 0.001$	-
	0.81	$P < 0.001$	-

Ein Vergleich unserer IC_{50}^I - und IC_{50}^{II} -Werte mit den IC_{50} -Werten der Projektpartner zeigte aufgrund der Anwendung unterschiedlicher Messzeitpunkte und Messverfahren sowie Zelltypen und Zellkultivierungsmethoden unterschiedliche Ergebnisse für die IC_{50} -Werte (siehe Tabelle 6).

Bei der Betrachtung der Werte für die Adhäsionsmessungen ist aufgefallen, dass die Messungen mit den IDEs der GNCs niedrigere IC_{50} -Werte (0,35 - 0,39 mM) für die MEPC ergaben als mit den IDEs der MCs des BAS (MEPC: $2,98 \text{ mM} \pm 0,05 \text{ mM}$; SNC: $1,91 \text{ mM} \pm 0,06 \text{ mM}$) (siehe Tabelle 6). Dieser Unterschied lässt sich damit erklären, dass die Versuchstiere von unterschiedlichen Anbietern bezogen wurden. Für die Versuche auf den GNCs (Koester et al., 2010) wurden die NMRI-Mäuse von der zentralen Versuchstierhaltung der Universität Rostock verwendet. Im Rahmen des DNT-Projektes (Buehler et al., 2011; 2012a) mussten die NMRI-Mäuse von einem zertifizierten Anbieter (Charles River Laboratories International, Inc. Wilmington, MA, USA) bezogen werden. Um diesen Sachverhalt eingehender klären zu können, bedarf es weiterer Experimente.

Die erhaltenen IC_{50} -Werte der Messungen der elektrischen Aktivität, metabolischen Parameter und des intrazellulären ATP-Gehalts von MEPC und SNC befinden sich jedoch alle im Größenordnungsbereich der in der Literatur zu findenden Werte (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Ermittelte *in vitro*- und *in vivo*-Grenzwerte für NAVPA zur Referenzierung der im DNT-Projekt ermittelten IC_{50} -Werte. Es gilt zu beachten, dass die in der Literatur angegebenen Werte ohne Berücksichtigung von *in vivo* relevanten Parametern (siehe Ab-

schnitt 6.2.) nach dem in Buehler et al. (2011) angegebenen Schema in Molaritäten umgerechnet wurden.

Literatur	Versuchsobjekt	Grenzwert	Wert [mM]
Löscher et al. (1984)	Maus i. v. (<i>in vivo</i>).	LD ₅₀	3,8-4,3
	Maus i. p. (<i>in vivo</i>).	LD ₅₀	4,6-5,6
Hauck et al. (1991)	Maus i. p. (<i>in vivo</i>).	ED ₅₀	0,46-1,06
FA. Sigma Aldrich	Ratte p. o. (<i>in vivo</i>).	LD ₅₀	4,03
Gross et al. (1995)	Neuronale spinale Säugerzellen (<i>in vitro</i>): Spontane elektrische Aktivität.	IC ₅₀	0,3-0,7
Koester et al. (2010)	Embryonale Maus-Kortexzellen (<i>in vitro</i>): Spontane elektrische Aktivität.	IC ₅₀	0,3-0,8
	Embryonale Maus-Kortexzellen (<i>in vitro</i>): Adh.	IC ₅₀	0,35-0,39
	Embryonale Maus-Kortexzellen (<i>in vitro</i>): ATPA.	IC ₅₀	1,75-0,18
Vreugdenhil et al. (1998)	Humane Kortexzellen (<i>in vitro</i>): Aktivität von Natriumkanälen.	EC ₅₀	1,4 ± 0,2

Legende: EC₅₀: halbmaximale Konzentration eines Inhibitors (Agonisten) bei der 50% einer Population inhibiert werden (*in vitro*), ED₅₀: halbmaximale Dosis eines Wirkstoffs (Agonist oder Antagonist) der bei 50% einer Population einen (therapeutischen) Effekt zeigt, i.m.: intramuskulär, i.p.: intraperitoneal, i.v.: intravenös, p.o.: peroral.

6. Diskussion

6.1 Silizium- und Glaschipsysteme

Auf Silizium basierende Systeme bieten neben einer relativ großen Anzahl an integrierbaren Sensoren (z.B. Clark-Typ-Sensoren, ISFETs, IDEs usw.) die Möglichkeit der Integration einer „Ansteuerungs- und Datenerfassungselektronik“. Silizium hat als Substrat für Mikrochips den Nachteil, dass es aufgrund seiner Dotierung mit Fremdatomen eine gewisse Leitfähigkeit aufweist. Dies kann zu elektrischen Kopplungen, d.h. zum Übersprechen von Messsignalen führen. Weiterhin sind Si-basierende Mikrochips gegenüber mechanischen (z.B. Sensoroberflächen beim Reinigen) und chemischen Einflüssen bezüglich Passivierungsdefekten über den Leiterbahnen empfindlich. Weiterhin ist z.B. der MC nicht autoklavierbar (z.B. reißen der Bondverbindungen aufgrund unterschiedlicher Ausdehnungskoeffizienten der verwendeten Materialien) und zeigt nach Langzeitkulturen eine eingeschränkte Wiederverwendbarkeit auf.

Glas ist aufgrund seiner Eigenschaft als Nichtleiter ein ideales Substrat für Mikrochips. Im Gegensatz zu Si-Chips treten substratbedingt geringere elektrische Kopplungen auf. Ein weiterer Vorteil von Glas ist dessen Transparenz, die eine mikroskopische Kontrolle bzw. Beobachtung auch während Messungen erlaubt. Weiterhin erlaubt die Transparenz des Glases den Einsatz von aufklebbaren optischen Sensoren zur Detektion von z.B. pH, CO₂, und O₂ (www.presens.de) die bei Kontakt mit der entsprechenden Substanz ihr optisches Absorptionsspektrum ändern. Nachteilig hingegen ist, dass die durch die Si-Technologie gegebene Möglichkeit der Integration einer „On-Chip-Elektronik“ auf Glas sehr kostenintensiv wäre. Auch die Anzahl der bisher in Glas integrierbaren Sensoren ist noch nicht vergleichbar mit den auf Si-Technologie basierenden Chips (Buehler et al., 2012b). Der Einsatz von GNCs während Langzeitzellkulturen zeigte im Gegensatz zu den auf Si-basierenden MCs geringere Ausfallraten von Sensoren. Auch die hohe Wiederverwendbarkeit der GNCs (ohne Einbußen von Sensorleistungen) hat sich wiederholt gezeigt (Koester et al., 2010).

Um der Problematik der Anfälligkeit der MCs entgegenzuwirken sowie eine stabile Langzeitzellkultur zu ermöglichen, wäre die Entwicklung und Integration von metabolischen Sensoren in die sich als widerstandsfähiger erwiesen haben den GNCs denkbar. Ein solcher Chip kann zur Ermittlung mehrerer IC₅₀-Werte

gleichzeitig im Rahmen von Substanzscreenings z.B. bei der Entwicklung neuer Tierversuchersatzmethoden, eingesetzt werden.

Die Ermittlung vergleichbarer Ergebnisse basierte auf der Synchronisierung der Kultivierungszeiträume von MEPC und SNC und wurde unter Berücksichtigung von Literaturdaten gemacht. Okabe et al. (1996) züchteten Embryoidbodies (EBs) aus ES-D3-Stammzellen. Diesen wurde nach vier Tagen in Suspensionskultur die Adhäsion ermöglicht. Ein Tag nach der Adhäsion wurde das serumhaltige Kultivierungsmedium gegen ein serumfreies Differenzierungsmedium ausgetauscht. Unmittelbar danach begannen aus den EBs Zellen auszuwandern. Nach weiteren fünf bis sieben Tagen in Kultur wurde mit diesen Zellen mittels spezifischer Antikörper für Marker von neuronalen Vorläuferzellen (Nestin) und ausgereifte neuronale Zellen (MAP-2) eine Immunfärbung durchgeführt. Es ergab sich eine Ausbeute von 80% Nestin-positiven Zellen und 15% MAP-2-positiven Zellen. Unter Verwendung eines modifizierten Differenzierungsmediums konnten mehr als 60 % MAP-2-positive Zellen nachgewiesen werden. Nach einer Kultivierungsdauer von 12 Tagen war bei diesen Zellen eine spontane elektrische Aktivität mittels Patch-Clamp-Technik nachweisbar. Der Zeitraum dieses Differenzierungsprotokolls überlagert sich mit dem von uns bereits bekannten Zeitraum der Generierung von Aktionspotentialen durch MEPC (Koester et al., 2010). Aus diesem Grund wurden der Kultivierungs- und Differenzierungszeitraum von MEPC und SNC auf 12 Tage festgelegt. Der Tag der Aussaat von MEPC und von ES-D3-Zellen ohne LIF, dem Differenzierungsbeginn, wurde als (day in vitro) DIV 1 bezeichnet.

6.2 Zum Zusammenhang zwischen IC_{50} - *in vitro*- und LD_{50} - *in vivo*-Werten

Der IC_{50} -Wert wird als diejenige Konzentration bezeichnet bei der ein Inhibitor eine halbmaximale Inhibition des gemessenen Effektes, z.B. die Ansäuerungsrate bei Zellen, bewirkt.

Die letale Dosis (LD) wird als vergleichende Größe für die Letalität einer bestimmten Substanz in einer bestimmten Zeit herangezogen, deren Bestimmung an einem Kollektiv von Organismen erfolgt. Da sich die toxische Wirkung von Substanzen zwischen verschiedenen Tierarten sowie zwischen Menschen und Tieren sowohl qualitativ als auch quantitativ stark unterscheiden kann, sind die an Tieren ermittelten LD-Werte nur sehr eingeschränkt auf den Menschen übertragbar und können nur als grobe Anhaltswerte.

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden im Rahmen der Arbeiten zum DNT-Projekt (Pirow et al., 2009) die zu ermittelnden IC_{50} -Werte in der Einheit mol/l als Messwertvergleichsgröße aller Projektpartner festgelegt. Da es sich bei den durchgeführten Versuchen mit neuronalen Zellen ausschließlich um zelluläre *in vitro*-Experimente handelte, erfolgten die Substanzapplikationen direkt in das die Zellen umgebende Medium. Dies wäre in *in vivo*-Versuchen mit einer direkten Applikation in den Liquor vergleichbar. Das Verhalten der Substanz im MC bzw. GNC, die als stationäre Systeme (ohne Durchfluss) zu betrachten sind, kann in unterschiedlichen pharmakokinetischen Szenarien anhand der räumlichen Betrachtung der involvierten Kompartimente dargestellt werden:

- (1) Es stellt sich ein Substanzkonzentrationsgleichgewicht zwischen Intra- und Extrazellularraum ein (2 Kompartiment Modell). Das heißt eine letale Substanzreaktion findet, wenn überhaupt, dann nur im Zytoplasma oder an der Zellmembran statt.
- (2) Ein Gleichgewicht stellt sich zwischen Zytoplasma und Zellorganelle sowie zwischen Intra- und Extrazellularraum ein (3-Kompartiment Modell). Eine letale Substanzreaktion findet entweder im Zytoplasma, an der Zellmembran oder im Zellorganell bzw. dessen Membran statt.
- (3) Eine letale Reaktion findet durch Metaboliten der Substanz im Zellorganell oder im Zytoplasma bzw. an deren Membranen statt (3-Kompartiment Modell). Ein Gleichgewicht zwischen Substanz und ihren Metaboliten stellt sich zwischen Zytoplasma und Zellorganelle sowie zwischen Intra- und Extrazellularraum ein.
- (4) Eine letale Reaktion findet durch eine strukturell bedingte Akkumulation von Metaboliten der Substanz im Zellorganell oder im Zytoplasma bzw. deren Membranen statt. Es erfolgt keine Gleichgewichtseinstellung der Metabolite-Konzentrationen zwischen Zytoplasma und Zellorganelle sowie Intra- und Extrazellularraum.

Die ermittelten IC_{50} -Werte sind modellabhängig. Da die IC_{50} -Werte zellspezifisch und ohne die Berücksichtigung wichtiger, bei *in vivo*-Testungen zu beachtender Parameter erfolgte (Art der Applikation, Bioverfügbarkeit, Verteilungsvolumen der Substanz, Metabolismus, sekundäre Metabolite, Vorbelastung des Spenderorganismus, Ausscheidung) geben sie nur den spezifischen IC_{50} -Wert der Substanz für

den getesteten Zelltyp an, der aber nur eingeschränkt auf den Gesamtorganismus übertragen werden kann.

Der zeitliche Verlauf dieser Parameter bestimmt letztendlich die letale Dosis einer Substanz für ein bestimmtes Individuum, berücksichtigt jedoch nicht den einzelnen Gewebe- bzw. Zelltyp und dessen metabolisches Verhalten gegenüber der entsprechenden Substanz hinsichtlich zusätzlich entstehender toxischer Metaboliten. Die Bestimmung eines Grenzwertes einer Substanz für nur einen spezifischen Gewebe- bzw. Zelltyp ist *in vivo* somit nicht möglich.

Eine solche Näherung an *in vivo* ermittelte LD_{50} -Werte würde eine theoretische Abschätzung der LD_{50} aus *in vitro*-Daten erlauben. Dieser Wert würde die gewebespezifische letale Dosis einer Substanz unter Berücksichtigung der *in vivo* ermittelten Verteilungsvolumina (V_D) und Verteilungskoeffizienten (V_K) der entsprechenden Substanzen in den Intra- und Extrazellularräumen der einzelnen Gewebetypen der getesteten Spezies (hier Maus) darstellen. Die Bioverfügbarkeit, Metabolisierung und Ausscheidung der Substanz durch andere Gewebe würden allerdings dabei nicht in die Berechnung mit einbezogen werden können.

Madeira et al. (1984) ermittelten bei Versuchen an den Membranen von Mitochondrien, Rattenleberzellen, Mikrosomen aus Schafhirnzellen und artifiziellen Membranen den V_K von Parathion. Dabei konnte mit zunehmendem Anteil an Cholesterin in der betreffenden Membran eine Abnahme der intramembranösen Parathionkonzentration festgestellt werden. Für die Mikrosomen- und Mitochondrienmembranen in Hirngewebe mit ihrem relativ niedrigen Anteil an Cholesterin wurde eine hohe Membranpermeabilität für Parathion ($V_K = 0,97$) festgestellt. Das Verteilungsvolumen von Parathion wurde mit $V_{D \text{ Ratte}} = 21,93 \text{ l/kg}$ angegeben (Krieger et al., 2001).

Die Multiplikation des o.g. Verteilungsfaktors und -volumens mit den von uns ermittelten IC_{50} -Werten für Parathion könnte zu den entsprechenden, aus *in vitro*-Daten theoretisch berechneten, LD_{50} -Werten führen. In Bezug auf Parathion wäre aber eine solche Berechnung sinnlos, da der LD_{50} für Parathion in erster Linie die Dosis für die Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE) im zentralen- und vegetativen Nervensystem sowie an den motorischen Endplatten durch dessen Metaboliten Paraoxon beschreibt. Die Hemmung der AChE ist *in vivo* tödlich.

Nau et al. (1981) ermittelten im Rahmen der Erstellung eines Modells für die Embryotoxizitätstestung in *in vivo*-Versuchen an Mäusen Verteilungsvolumina von

$V_{D \text{ Maus}} = 0,3 \text{ l/kg} - 0,6 \text{ l/kg}$ ($V_{D \text{ Maus } \varnothing} = 0,45 \text{ l/kg}$) für NaVPA. Poklis et al. (1998) stellte bei der postmortalen Analytik eines mit NaVPA vergifteten Menschen eine Blutkonzentration von 1050 mg/kg und eine Hirngewebekonzentration von 510 mg/kg fest. Da Blut aus ähnlichen Anteilen an Zellen (44% Erythrozyten, 1% Leukozyten und Thrombozyten) und Plasma (55%) besteht, konnte eine Plasmakonzentration von annähernd 578 mg/kg bestimmt werden. Der aus Plasma- und Hirngewebs-NAVPA-Konzentrationen ermittelte V_K für NaVPA betrug demnach 1,13. Das heißt, dass die Plasmakonzentration nahezu der Gewebekonzentration entspricht. Die Berechnung der theoretischen LD_{50} -Werte aus *in vitro*-Daten würde nach o.g. Schema erfolgen.

Eine direkte Vergleichbarkeit mit im Tierversuch ermittelten LD_{50} -Werten ist jedoch nicht möglich. Um unsere ermittelten *in vitro*- IC_{50} -Werte dennoch gegenüber *in vivo*- LD_{50} -Werten einordnen zu können, wurde nach dem von Ockham (http://de.wikipedia.org/wiki/Ockhams_Rasiermesser) aufgestellten Prinzip der einfachsten Lösung (Zitat: „Steht man vor der Wahl mehrerer möglicher Erklärungen für ein und dasselbe Phänomen, soll man diejenige bevorzugen, die mit der geringsten Anzahl an Hypothesen auskommt und somit die „einfachste“ Theorie darstellt“) verfahren. Dies bedeutete in unserem konkreten Fall, die Dosis als grobe Abschätzung, ausgehend von der Betrachtung eines vorliegenden 2-Kompartimentsystems (Medium/Zelle), in eine Konzentration umzurechnen (Buehler et al., 2011). Die Problematik des Vergleichens von *in vivo* und *in vitro* ermittelten Grenzwerten ist gerade bei der Entwicklung von tierfreien Ersatzmethoden zum Tierversuch eine noch ungeklärte zentrale Fragestellung, die nur durch eine bestmögliche Annäherung des *in vitro*-Ersatzsystems an *in vivo*-Verhältnisse geklärt werden könnte. Die mit unseren *in vitro*-Systemen ermittelten IC_{50} -Werte und die ermittelten Ergebnisse der DNT-Projektpartner (Abb. 7, Abbn. 8, Abb. 9, Abbn. 10, 11, 12; Tabellen 4, 6) entsprechen annähernd den *in vivo*- LD_{50} -Werten der Literatur (Vergleich Tabelle 4 mit 5 und Tabelle 6 mit 8) Neben den IC_{50} -Werten konnte in dieser Arbeit jedoch eine Hormese, bevorzugt bei niedrigen Parathion- und NaVPA-Konzentrationen festgestellt werden.

6.3 Hormese - Bedeutung und Problematik

Der Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung einer Substanz gilt als grundlegendes Konzept der Toxikologie. Seit Jahrzehnten dominiert das in der Toxikologie angewandte Schwellenwertmodell ("threshold model"), welches bislang für die

Abschätzung von Gesundheitsrisiken herangezogen wurde (z.B. bei der Untersuchung von Schwermetallen in Trink- und Abwässern). Bei dem Schwellenwertmodell wird davon ausgegangen, dass eine Substanz eine bestimmte Konzentration überschreiten muss, um toxische Effekte auszulösen. Konzentrationen unter diesem Grenzwert hingegen würden keine nachteiligen Wirkungen verursachen. Weitere Effekte werden jedoch nicht beschrieben. Parallel dazu existieren verschiedene alternative Modelle wobei das Hormese-Modell (Calabrese et al., 2003) am geeignetsten erscheint. Dieses Modell beschreibt nicht nur die im Schwellenwertmodell erwähnten toxischen Effekte, sondern auch die Effekte unterhalb des Schwellwertes. Viele als toxisch geltende Substanzen (Digitalis, Kolchizin, Opium oder Botulinumtoxin) haben z.B. bei einer entsprechenden niedrigen Dosierung nachweislich positive Effekte (Paracelsus 1493-1541; Arndt-Schulz-Gesetz, 1887), die für einen Wirkstoff charakteristisch sind. Bei der Charakterisierung von niedrigen Dosen eines Wirkstoffs werden dessen Reaktionen auf einen oder mehrere zellspezifische Parameter in das Verhältnis zu einer Kontrolle gesetzt. Der Verlauf von hormetischen Reaktionen kann sich in einem unterschiedlichen Verhalten der Dosis-Wirkungskurven je nach Wirkstoff und Endpunkt äußern (lineares-, J-förmiges-, U-förmiges-, invers U-förmiges Modell, Calabrese et al., 2004, 2008).

Diese hormetischen Modelle bestreiten jedoch nicht die Aussagekraft des Schwellenwertmodells sondern erweitern es vielmehr um das Wissen, dass die Reduzierung einer Dosis oder Konzentration nicht nur als quantitative, sondern auch als eine qualitative Änderung gemessen werden kann. Zum Beispiel konnte im Gegensatz zu der vorherrschenden Ansicht, dass so gering auch die Dosis eines Kanzerogenes sein mag, sie auf alle Fälle zur Erhöhung des Krebsrisikos beiträgt, bewiesen werden, dass, wenn man die Dosis dieses Kanzerogenes unterhalb dessen Schwellenwertes reduziert und über einen gewissen Zeitraum appliziert, eine Art „Immunisierung“ induziert. Das Risiko an einem Tumor zu erkranken nahm dabei gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe ab. Im Gegensatz dazu nahm das Risiko an einem Tumor zu erkranken mit zunehmender Dosis oberhalb des Schwellenwertes zu. Ein Beispiel dafür ist das als kanzerogen bekannte Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT; J-förmiger Hormesekurvenverlauf; Fukushima et al., 2005; Kushida et al., 2005). Ein anderes Beispiel sind die von uns durchgeführten Messungen der metabolischen Parameter von Parathion (Buehler et al., 2011) und NaVPA (Buehler et al., 2012a). Dabei ist aufgefallen,

dass bei niedrigen Substanzkonzentrationen die Werte der metabolischen Parameter Respiration, Ansäuerung und zum Teil intrazellulärer ATP-Gehalt in einem begrenzten Konzentrationsbereich (Buehler et al., 2011; 2012a), entgegen der Erwartung („threshold model“), zunahmen (invers U-förmiger Kurvenverlauf der Hormese (Buehler et al., 2011, 2012a).

Die Darstellung hormetischer- und inhibierender Effekte in einem Kurvenverlauf ist anhand herkömmlicher, logistischer Standardgleichungen (siehe 4.5.3) nicht möglich. Aus diesem Grund wurde eine 4-parametrische logistische Standardgleichung entwickelt, die die auftretende Hormese berücksichtigt (siehe 4.5.3). Die zum Fitten der Hormese verwendete Gleichung ist die Summe aus drei addierten Termen, wobei die ersten beide Terme der Gleichung 1 (siehe 4.5.3) entsprechen. Während die Graphen des Fits mit Gleichung 2 dem Punkteverlauf folgen entstehen bei der Berechnung für den Parameter der Gleichung 1 extreme Werte und Standardabweichungen.

Die Anwendung von Gleichung 2 bietet den Vorteil einer relativ einfachen Handhabung, birgt aber die Problematik der durch die Hormese bedingten Verschiebung der Halbwertshöhen ($IC_{50}^{Gl.2}$). Aus diesem Grund mussten die IC_{50} -Werte bei 50% des Kontrollwertes aus dem Fit abgelesen werden (siehe Abb. 13). Diese Werte werden als IC_{50}^{II} bezeichnet. Der ist ein phänomenologischer IC_{50}^{II} -Wert.

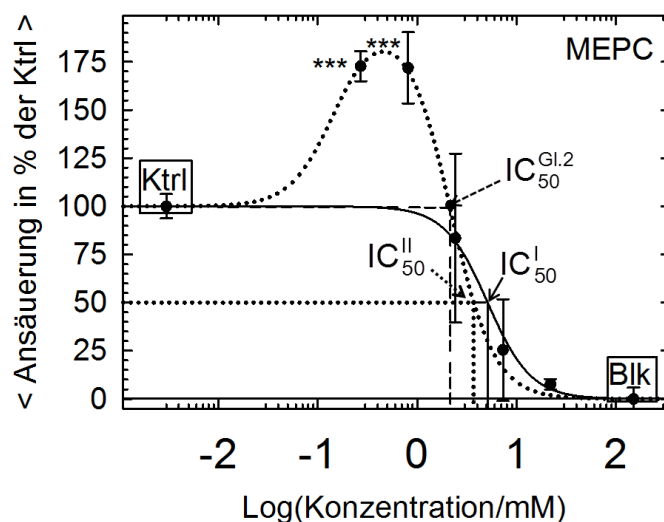


Abb. 13: Darstellung des Zusammenhangs zwischen $IC_{50}^{Gl.2}$ und IC_{50}^{II} am Beispiel der Fits der Ansäuerung (Buehler et al., 2012a, 500-530 min), bei der Ermittlung der IC_{50} -Werte in % der Kontrolle (Ktrl) für NaVPA an MEPC. Der Wert für die Ktrl wurde 100%, der Wert für den Leerwert (hier als Blank (Blk) bezeichnet, 0% gesetzt.

Der durch das Fitten mit Gleichung 1 ermittelte IC_{50}^I ($5,11 \pm 1,21$ mM NaVPA) ist mittels durchgezogener Linien dargestellt. Der durch das Fitten mit Gleichung 2 ermittelte $IC_{50}^{Gl.2}$ (Buehler et al., 2011, 2.9) ist durch lang-unterbrochene Linien dargestellt. Dieser Wert

stellt den „gefitteten“ IC_{50} -Wert mit Gleichung 2 dar. Der IC_{50}^{II} (kurz-unterbrochene Linien) wurde durch das Ablesen des Wertes an der durch Gleichung 2 ermittelten Fitkurve (gepunktete Kurve) bei 50% des Kontrollwertes ermittelt. Die unterschiedlich Lage und damit die Problematik zwischen dem $IC_{50}^{Gl.2}$ ($2,16 \pm 0,24$ mM NAVPA) Wert und IC_{50}^{II} ($3,74 \pm 0,24$ mM NAVPA) ist deutlich erkennbar.

Die Wahl wann welche der Gleichungen am sinnvollsten angewendet werden sollte wird durch die Ermittlung der Signifikanz der Hormesewerte bei Konzentrationen unterhalb der IC_{50} -Werte gegenüber den Kontrollwerten bestimmt. Sind die Hormesewerte signifikant unterschiedlich gegenüber den Kontrollwerten so muss Gleichung 2, wenn nicht, muss Gleichung 1 zur Anwendung kommen. Für eine bessere Übersicht wurden die Fits beider Gleichungen in den Abbildungen von Buehler et al. (2012a), soweit möglich, dargestellt. Um jedoch eine präzisere Aussage über die aufgetretenen Hormesen treffen zu können, müssten in dem betreffenden Konzentrationsbereich detailliertere Messreihen durchgeführt werden. Das Vorhandensein der Hormese muss in zukünftigen Substanzscreenings in Abhängigkeit von Vorbelastungen des zu untersuchenden Zellmaterials mit der entsprechenden Substanz geprüft werden, da die Betrachtung der Hormese als Paradigmenenerweiterung für die Beschreibung der Reaktionen biologischer Systeme auf niedrige Dosen chemischer oder physikalischer Einflüsse zu verstehen ist.

Im Rahmen unserer Untersuchungen ermöglichte das Auftreten von Hormese die Involvierung eines zusätzlichen Parameters bei der Charakterisierung von Substanzwirkungen. Zur zukünftigen Rolle der Chiptechnologie im Rahmen von Tierversuchersatzmethoden

Auf Glas basierende Chips bieten gegenüber Si-Chips den Vorteil weniger anfällig gegenüber mechanischen Einflüssen (z.B. Reinigung, Autoklavieren) und damit öfter wiederverwendbar zu sein. Ein weiterer Vorteil bietet die Möglichkeit der Auf- und Durchlichtmikroskopie während der Datenaufnahme.

Eine Kombination der im MC eingesetzten aber für den Einsatz auf Glaschips modifizierten Sensortypen, mit den bereits auf dem GNC vorhandenen Sensoren auf einem separaten Chip, würde ein breiteres Spektrum an Informationen über die Reaktionen von Zellen auf Substanzzugaben ermöglichen. Ein solcher Chip ist bereits in Planung und wird in Buehler et al. (2012b) detaillierter beschrieben. Der auf Glas basierende „Glass-Cell-Culture-Chip (GC³)“ beinhaltet alle Sensoren des

GNCs, zusätzlich O₂- und pH-Sensoren (Bonk et al., 2012) sowie ET μ P-Mikropumpen (Gimsa et al., 2005, 2007; Stubbe et al., 2010, 2011).

Der GC³ soll so konstruiert werden, dass der Aufbau eines aus mehreren Chips bestehenden modularen Systems machbar wird. Dieses wird ein langlebiges, wiederverwendbares, robustes, nicht-invasives und mikroskopierbares Testsystem im Bereich der medizinischen, biologischen Grundlagenforschung, der pharmazeutischen Produktentwicklung, der toxikologischen Forschung und ganz allgemein in der Diagnostik darstellen. Die modulare Bauweise erlaubt die *in vivo*-nahe Simulation eines lebenden Organismus. Bei der Zusammenschaltung mehrerer einzelner GC³ können auch mehrere Gewebetypen zum Einsatz kommen, wobei der Weg einer applizierten Substanz im Organismus durch die entsprechende Kombination der auf den einzelnen LOCs wachsenden Gewebetypen *in vitro* angepasst und vom Beginn der Aufnahme bis zum Metabolismus simuliert werden kann (Absorption, Distribution and Metabolism, ADM). Der Transport der Metabolite und des Versorgungsmediums würde durch ein, in die GC³ integriertes ET μ P-Array, von Gewebe zu Gewebe zeitaufgelöst erfolgen. Die Auswertung der bei einer solchen Messung erhaltenen Grenzwerte (IC₅₀) kämen den in *in vivo* ermittelten LD₅₀-Werten bereits etwas näher. Weiterhin werden sich auch komplexe Metabolisierungsmuster oder Sekundäreffekte untersuchen lassen (z.B. Hormese und die Reversibilität des Gewebes nach Wirkstoffeinfluss). Ein solches Mehrkompartimentsystem (Sonntag et al., 2010) in Kombination mit der von uns entwickelten Methode und unter Einsatz von stammzelldifferenzierten Gewebetypen käme einem lebenden Organismus schon recht nahe und könnte daher z.B. als Alternative für den „Oral-Acute-Toxicity-Test (LD₅₀-Methode)“, (<http://alttox.org/ttrc/validation-ra/validated-ra-methods.html>) dienen, der bis dato noch immer an lebenden Tieren durchgeführt wird. Der Ausbau der Chiptechnologie für das Substanzscreening im Rahmen von Tierversuchersatzmethoden ist demnach nicht nur im ethischen Sinne und wirtschaftlich gewinnbringend, sondern auch wissenschaftlich von Bedeutung, da neben der Einsparung an Kosten mehr und detailliertere Informationen aus den Versuchen gewonnen werden könnten.

7. Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit waren Messungen zur Wirkung des Insektizids Parathion und des Antiepileptikums NaVPA auf murine, embryonale, cortikale Primärzellen (MEPC) im Vergleich mit neuronalen Zellen, die aus murinen, embryonalen Zellen (SNC) der Stammzelllinie D3 differenziert wurden und einen vergleichbaren Entwicklungsstand aufwiesen. Die Substanzen waren Teil eines Testsubstanzsets, neurotoxischer und entwicklungsneurotoxischer Modellsubstanzen, das in Kooperation mit den Partnern eines BMBF-Projektes (DNT-Projekt) bearbeitet wurde. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte der metabolischen Parameter (Respiration, Ansäuerung und Adhäsion) sowie des intrazellulären ATP-Gehalts von MEPC und SNC unter Einfluss von NaVPA und Parathion erfolgte mithilfe kommerzieller Systeme (BAS und ATPA). Parallel dazu erfolgte die Messung der elektrischen Aktivität und des Adhäsionsverhaltens von MEPC unter dem Einfluss von NaVPA und Parathion auf einem eigens entwickelten MOGS. Um LD_{50} -Literaturwerte zur Referenzierung heranziehen zu können, wurden aus diesen Konzentrationen abgeschätzt.

Für beide Zellarten korrespondierten die ermittelten IC_{50} -Werte weitgehend mit *in vitro*- und LD_{50} -Literaturwerten. Generell waren die ermittelten IC_{50} -Werte der SNC unter dem Einfluss von NaVPA niedriger als die der MEPC, was für eine höhere Empfindlichkeit der SNC spricht.

Bei Substanzkonzentrationen unterhalb der IC_{50} -Werte wurde mit dem BAS und dem ATPA sowohl bei MEPCs als auch bei SNCs eine reproduzierbare signifikante Hormese gemessen. Für die quantitative Auswertung wurde eine erweiterte logistische Gleichung entwickelt. In der Literatur wurden Hormesen bei der Auswertung von Messdaten in der Regel nicht berücksichtigt und die IC_{50} -Werte mithilfe einfacher logistischer Standardgleichungen bestimmt. Interessanterweise trat eine reproduzierbare signifikante Hormese bei MEPC für den Parameter Zelladhäsion sowie bei SNC für alle metabolischen Parameter nicht auf. Die mit dem ATPA ermittelte Hormese für SNC lag außerhalb der für die Messungen mit dem BAS festgelegten NaVPA-Konzentrationsreihe. Die Erfassung der Hormese war ursprünglich nicht Ziel der Arbeit. Sie kann jedoch als ein sehr empfindlicher Parameter betrachtet werden, der bei der Planung zukünftiger Experimente unbedingt berücksichtigt werden sollte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde als Kriterium für die Berücksichtigung der Hormese für die Ermittlung von IC_{50} -Werten, die Signifikanz der Hormesemesspunkte im Konzentrations-Bereich unterhalb der betreffenden IC_{50} -Werte gegenüber den Kontrollwerten herangezogen (typischerweise bei einer um ca. Faktor 3 niedrigeren Konzentration).

Aufgrund der vergleichbaren Größen aller ermittelten Ergebnisse für MEPC und SNC sowie der Ähnlichkeit mit den Ergebnissen der Projektpartner und Werten aus der Literatur ist es fraglich, ob mit den gewählten Endpunkten ausreichende und aussagekräftige Ergebnisse hinsichtlich der Entwicklungsneurotoxizität abgebildet werden können oder ob es sich im Wesentlichen um die Abbildung der Neurotoxizität handelt.

Die Arbeit bringt den Nachweis, dass LOC- basierende *in vitro*-Substanzscreenings eine detailliertere und präzisere Abbildung der Wirkung von Substanzen auf die entsprechenden Parameter von Zellen bieten als die bisher verwendeten Life-Dead-Assays. Die entwickelte Methodik eignet sich potentiell für Tierversuchersatzmethoden im Rahmen des 3R-Prinzips

8. Ausblick

Im Bereich der medizinischen und biologischen Grundlagenforschung, der pharmazeutischen Produktentwicklung sowie der allgemeinen toxikologischen Forschung und Diagnostik stellen Tierversuche noch immer das Mittel der Wahl dar. Es wird zwar versucht, die Anzahl der Tierversuche zu reduzieren bzw. zu ersetzen, aber aufgrund des Inkrafttretens neuer Gesetze und Richtlinien (REACH u.a.) werden die Tierversuchszahlen in nächster Zukunft eher steigen. Mittlerweile gibt es zwar *in vitro*-Ersatzmethoden (*siehe Einleitung*), ein richtiger Durchbruch gelang jedoch bisher nicht. Desweiteren basieren diese sogenannten *in vitro*-Tierversuchersatzmethoden zum Teil widersprüchlicherweise auf Tieren (ATC-Test, *siehe Einleitung*).

Eine Alternative würden Multisensor-LOCs in Kombination mit Zellen und Geweben bieten. Diese würden z.B. eine kontinuierliche, nicht-invasive Messung des Einflusses von Substanzen auf zellphysiologische Parameter (Respiration, Ansäuerung, Adhäsion, usw.) eines spezifischen Gewebetyps erlauben. Unter Verwendung der LOCs, MC und GNC konnte während der Bearbeitung des DNT-Projektes eine Methode etabliert werden, welche die Wirkung von Substanzen bei einem minimalen Einsatz an MEPC und SNC aufzeigen kann. Der Einsatz dieser Methode in Kombination mit aus ES-D3-Zellen differenzierten, neuronalen Zellen, erlaubte Messungen unter Verzicht von Tieren als Zellmaterialsponder. Ein weiterer Ausbau der LOCs in Kombination mit *in vitro* basierenden Multi-Organoid-Systemen sollte in *in vivo*-Prozesse wie die Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion einbeziehen um der Lösung des Problems des Vergleiches von *in vitro* mit *in vivo*-Daten näher zu kommen.

9. Literaturverzeichnis

Andersson, H., v. d. Berg, A. (2003). Microfluidic devices for cellomics: a review. *Sensor Actuat. B-Chem.* 92, 315–325.

Auroux, P.A., Iossifidis, D., Reyes, D.R., Manz, A. (2002). Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Anal. Chem.* 74, 12, 2637-2652; DOI: 10.1021/Ac020239t.

Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E., Gottlieb, D. I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev. Biol.* 168, 342-357.

Balck, A., Michalzik, M., Al-Halabi, L., Dübel, S., Büttgenbach, S. (2011). Design and fabrication of a lab-on-a-chip for point-of-care Diagnostics. *Sensor Transducers J.*, 127, 4, 102-111.

Baumann, W.H. (1996). Entwicklung eines Messsystems zur zellulären Signalanalyse auf der Basis von Feldeffekttransistoren. S. 56. Inaugural-Dissertation, Albert-Ludwigs Universität Freiburg.

Baumann, W. H., Lehmann, M., Schwinde, A., Ehret, R., Brischwein, M., Wolf, B. (1999). Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells. *Sensor Actuat. B-Chem.* 55, 77-89.

Baumann, W., Schreiber, E., Krause, G., Podssun, A., Homma, S., Freund, I., Lehmann, M. (2004). Neuronal networks on multiparametric neurosensor microchips. International Workshop on Biophysics of cellular communication: Networks and molecular interactions. Gmadingen, Germany, 22.-24. March 2004.

Bausch, G., Schrott, R., Keuer, A., Baumann, W., Beikirch, H., Tautorat, C. (2005). Acquisition of biological neural network signals under real-time conditions. *4th International Symposium on Automatic Control*, Wismar 2005.

Bausch, G., Schrott, R., Tautorat, C., Kirchner, K.P., Baumann, W. (2007). Echtzeitauswertung neuronaler Sensordaten mit künstlichen neuronalen Netzen, *Leipzig Research Festival for Life Sciences 2007*, 44; ISBN 3-9810760-2-8.

Beikirch, H., Schrott, R., Keuer, A., Bausch, G., Baumann, W., Schreiber, E., Tautorat, C., Freund, I., Lehmann, M. (2005). Erfassung und Analyse von Aktionspotentialen eines neuronalen Mikrosensors unter Echtzeitbedingungen, Mikrosystemtechnik Kongress 2005, VDE Verlag, 430-442.

Bonk, S., Bühler, S.M., Stubbe, M., Tautorat, C., Litwinski, C., Klinkenberg, E.D., Baumann, W., Gimsa, J. (2012). Design and characterization of pH, oxygen and adhesion sensors as well as electro-thermal micro-pumps (ET μ Ps) for sensorized cell-culture systems. *In preparation*.

Bousse, L., McReynolds, R. J., Kirk, G., Dawes, T., Lam, P., Bemiss, W. R., Parce, J.W. (1994). Micromachined multichannel systems for the measurement of cellular-metabolism. *Sensor Actuat. B-Chem.* 20, 145-150.

Bousse, L., Parce, W., (1994). Applying silicon micromachining to cellular-metabolism. *IEEE Engin. Med. Biol. Mag.* 13, 396-401.

Bradley, A. (1990). Embryonic stem cells: proliferation and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 6, 1013-1017.

Brischwein, M., Grothe, H., Otto, A.M., Stepper, C., Motrescu, E., Weyh, T., Wolf, B. (2004). Living cells on chip: bioanalytical applications. In: Mirsky VM (ed) *Ultrathin electrochemical chemo-and biosensors*. Springer, Berlin, 159-180.

Buehler S.M., Stubbe, M., Gimsa, U., Baumann, W., Gimsa, J. (2010). Multifunktionale Glas-Neurochips: Eine Alternative zum Tierversuch. Steinbeis-Transferzentrum, Zell-Manipulations- und Monitoring-Systeme (CMMS). *Transfer. Das Steinbeismagazin*, S. 8-9, 1/2010, ISSN 1864-1768, Straub Druck + Medien AG, Schramberg.

Buehler, S.M., Stubbe, M., Gimsa, U., Baumann, W., Gimsa, J. (2011). A decrease of intracellular ATP is compensated by increased respiration and acidification at sub-lethal parathion concentrations in murine embryonic neuronal cells: Measurements in metabolic cell-culture chips. *Toxicol. Lett.* 207, 82-190.

Buehler, S.M., Stubbe, Baumann, W., Gimsa, J. (2012a). Cell culture-chip measurement of metabolic murine-cell parameters under the influence of valproate: embryonic primary cortex versus stem cell-derived neuronal cells. *In preparation*.

Buehler, S.M., Bonk, S.M., Stubbe, M., Reimer, T., Nissen, M., Gimsa, J. (2012b). Sensors for glass cell-culture chips (GC³) for the replacement of animal experiments. *In preparation*.

Calabrese, E. J., Baldwin, L. A., Holland, C. D. (1999). Hormesis: A highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment. *Risk Anal.* 19, 261-281.

Calabrese, E.J., Baldwin, L.A. (2003). The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicol. Sci.* 71, 246-250.

Calabrese, E. (2003). Hormesis: The Dose-response revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 175-197; PMID: 12195028.

Calabrese, E. J., (2008). Hormesis: Principles and applications for pharmacology and toxicology. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 3, 59-71.

Calabrese, E. J., (2010). Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. *Hum. Exp. Toxicol.* 29, 4, 249-261.

Cerioti, L., Ponti, J., Broggi, F., Kob, A., Drechsler, S., Thedinga, E., Colpo, P., Sabbioni, E., Ehret, R., Rossi, F. (2006). Real-time assessment of cytotoxicity by impedance measurement on a 96-well plate. *Sensor Actuat. B-Chem.* 123, 2, 769-778.

Cerioti, L., Kob, A., Drechsler, S., Ponti, J., Thedinga, E., Colpo, P., Rossi, F. (2007). Online monitoring of BALB/3T3 metabolism and adhesion with multiparametric chip-based system. *Analyt. Biochem.* 371, 92-104.

Cha, C.S., Shao, M.J., Liu, C.C. (1990). Problems associated with the miniaturization of a voltammetric oxygen sensor: Chemical crosstalk among electrodes. *Sensor Actuat. B-Chem.* 2, 23-2.

Chiou, P.Y., Ohta, A.T., Ming, C., W. (2005). Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images. *Nature* 436, 370-372; DOI: 10.1038/nature03831.

Clark, L. C. Jr., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z. (1953). Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J. Appl. Physiol.* 6, 3, 189-193.

Danckwerts, P.V. (1953). Continuous flow systems, distribution of residence times. Chem. Eng. Sci. 2, 1, 1-13.

Daridon, A., Fascio, V., Lichtenberg, J., Wutrich, R., Langen, H., Verpoorte, E., de Rooij, N.F. (2001). Multilayer microfluidic glass chips for microanalytical applications. Fresenius J. Analyt. Chem. 371, 261-269.

Debesset, S., Hayden, C.J., Dalton, C., Eijkel, J.C.T., Manz, A. (2002). A circular AC electroosmotic micropump for chromatographic applications. Micro TAS, 655-57.

Dittrich, P.S., Manz, A. (2006). Lab-on-a-chip: Microfluidics in drug discovery. Nat. Rev. Drug Discovery 5, 210-218; DOI: 10.1038/nrd1985.

Doetschmann, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler, R. (1985). The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J. Embryol. Exp. Morph. 87, 27-45.

Dunlop, J., Bowlby, M., Peri, R., Vasilyev, D., Arias, R. (2008). High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. Nat. Rev. Drug Discovery 7, 358-368; DOI: 10.1038/nrd2552.

Dunn, W. C., Stephen, C., Jacobson, L. C., Waters, N. K., Khandurina, J., Foote, R. S., Justice, M. J., Stubbs, L. J., Ramsey, J. M. (2000). PCR-amplification and analysis of simple sequence-length polymorphisms in mouse DNA, using a single-microchip device. Anal. Biochem. 277, 1, 157-160.

Duensee, H., Mix, M., Stubbe, M., Gimsa, J., Adler, M., Flechsig, G. U. (2009). Electrochemical product detection of an asymmetric convective polymerase chain reaction. Biosens. Bioelectron. 25, 400-405.

Dworak, B. J., Wheeler, B. C. (2009). Novel MEA platform with PDMS microtunnels enables the detection of action potential propagation from isolated axons in culture. Lab Chip 9, 3, 404-410; DOI: 10.1039/b806689b.

Ehret, R., Baumann, W., Brischwein, M., Schwinde, A., Stegbauer, K., Wolf, B. (1997). Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures. *Biosens. Bioelectron.* 12, 29-41.

Ehret, R., Baumann, W., Brischwein, M., Lehmann, M., Henning, T., Freund, I., Drechsler, S., Friedrich, U., Hubert, M.-L., Motrescu, E., Kob, A., Palzer, H., Grothe, H., Wolf, B. (2001). Multiparametric microsensor chips for screening applications. *Fresenius J. Anal. Chem.* 369, 30-35.

El-Ali, J., Sorger, P. K., Jensen, K. F. (2006). Cells on chips. *Nature* 442, 403-411.

Fertig, N., Blick, R. H., Behrends, J. C. (2002). Whole cell patch clamp recording performed on a planar glass chip. *Biophys. J.* 82, 3056-3062.

Finkelstein, Y., Wolff, M., Biegon, A. (1988). Brain acetylcholinesterase after acute parathion poisoning: A comparative quantitative histochemical analysis post mortem. *Ann. Neurol.*, 24, 2, 252-257.

Fleischmann, B.K., Hescheler, J. (2004). Stammzellen und ihre potentieller Einsatz für therapeutische Zwecke. *Biofokus, Mitteilungsblatt* 68.

Fuhr, G., Hagedorn, R., Göring, H. (1985). Separation of different cell types by rotating electric fields. *Plant Cell Physiol.* 26, 8, 1527-1531.

Fuhr, G., Zimmermann, U., Shirley, S. G. (1996). Cell motion in time-varying fields: principle and potential. In: *Electromanipulation of Cells*; U. Zimmermann and G. A. Neil, editors. Chemical Rubber Co. Press, Boca Raton, FL. 259-328.

Fuhr, G., Müller, T., Glasser, H., Gimsa, J., Hofmann, U., Wagner, B. (1997). Handling and investigation of adherently growing cells and viruses of medical relevance in three-dimensional microstructures. *Mems 97, Proceedings-IEEE the Tenth Annual International Workshop on Micro-Electro-Mechanical Systems* 344-049.

Fuhr, G., Glasser, H., Müller, T., Schnelle, Th. (1994). Cell manipulation and cultivation under AC electric field influence in highly conductive culture media. *Biochim. Biophys. Acta* 1201, 353–360.

Fukushima, S., Kinoshita, A., Puatanachokchai, R., Kushida, M., Wanibuchi, H., Morimura, K. (2005). Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis* 26, 11, 1835-1845; DOI: 10.1093/carcin/bgi160.

Gale, K., Iadarola, M. J., (1980). Seizure protection and increased nerve-terminal GABA: Delayed effects of GABA transaminase inhibition. *Science* 208, 288-291.

Giaever, I., Keese, C.R. (1984). Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3761-3764.

Giaever, I., Keese, C. R. (1991). Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 17, 7896-7900.

Giaever, I., Keese, C. R. (1993). A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* 366, 6455, 591-592.

Gimsa, J., Marszalek, P., Löwe, U., Tsong, T. Y. (1991). Dielectrophoresis and electrorotation of neurospora slime and murine myeloma cells. *Biophys. J.* 60, 5-14.

Gimsa, J., Müller, T., Schnelle, T., Fuhr, G. (1996). Dielectric spectroscopy of single human erythrocytes at physiological ionic strength: Dispersion of the cytoplasm. *Biophys. J.* 71, 1, 495-506.

Gimsa, J. (1999). New light-scattering and field-trapping methods access the internal structure of submicron particles, like influenza viruses. In: *Electrical bioimpedance Methods. Applications to Medicine and Biotechnology*. P. J. Riu, J. Rossell, R. Brago's, and O'. Casas, Editors. Ann. NY, Acad. Sci., New York. 287-298.

Gimsa, J. (2001). A comprehensive approach to electro-orientation, electro-deformation, dielectrophoresis, and electrorotation of ellipsoidal particles and biological cells. *Bioelectrochem.* 54, 23-31.

Gimsa, J., Holtappels, M. (2005). Pumpe mit mindestens einer Pumpkammer und Elektroden zum Erzeugen eines elektrischen Wechselfeldes F04B 19/00 (2006.01), F04B 43/04 (2006.01)(WO/2005/001286).

Gimsa, J., Holtappels, M., Stubbe, M. (2007). Elektrohydrodynamische Mikropumpe und deren Verwendung F04B 19/00 (2006.01)(WO/2007/098910).

Goater, A. D., Burt, J. P. H., Pethig, R. (1997). A combined traveling wave dielectrophoresis and electrorotation device: applied to the concentration and viability determination of *Cryptosporidium*. J. Phys., D, Appl. Phys. 30, L65-L69.

Gramowski, A., Juegelt, K., Weiss, D. G., Gross, G. W. (2004). Substance identification by quantitative characterization of oscillatory activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays. Eur. J. Neurosci. 19, 10, 2815-2825; DOI: 10.1111/j.0953-816X.2004.03373.

Grandjean, P., Landrigan, P. J. (2006). Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. Lancet 368, 2167-2178.

Gross, G. W., Rieske, E., Kreutzberg, G. W., Meyer, A. (1977) . New fixed-array multi-electrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal-activity *in vitro*. Neurosci. Lett. 6, 2-3, 101-105; DOI: 10.1016/0304-3940 (77) 90003-9.

Gross, G.W. (1979). Simultaneous single unit recording *in vitro* with a photoetched laser-deinsulated gold multi-micro-electrode surface. IEEE Transactionson biomedical engineering. 26, 5, 273-279; DOI: 10.1109/TBME.1979.326402.

Gross, G.W., Williams, A. N., Lucas, J. H. (1982). Recording of spontaneous activity with photoetched microelectrode from mouse spinal neurons in culture. J. Neurosci. 5, 1-2, 13-22; DOI: 10.1016/0165-0270 (82) 90046-2.

Gross, G. W., Rhoades, B. K., Azzazy, H. M., Wu, M. C. (1995). The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. Biosens. Bioelectron. 10, 553-567.

Hagedorn, R., Fuhr, G., Müller, T. Gimsa, J. (1992). Traveling-wave dielectrophoresis of microparticles. Electrophoresis 13, 1-2, 49-54.

Hamman, H.C., Vielstich, W. (2005). In: Elektrochemie, 4. Auflage. Wiley-VCH Weinheim; ISBN:3-527-31068-1.

Hauck, R.S, Nau, H. (1991). On the development of alternative antiepileptic drugs lack of enantioselectivity of the anticonvulsant activity, in contrast to teratogenicity, of 2-n-propyl-4-pentenoic acid and 2-n-propyl-4-pentynoic acid, analogues of the anticonvulsant drug valproic acid. *Naturwissenschaften* 78, 272-274.

Hendry, J.H., Simon, S.L., Wojcik, A., Sohrabi, M., Burkart, W., Cardis, E., Laurier, D., Tirmarche, M., Hayata, I. (2009). Human exposure to high natural background radiation: what can it teach us about radiation risks? *J. Radiol. Prot.* 29, A29-A42; DOI: 10.1088/0952-4746/29/2A/S03.

Herold, K.E., Rasooly, A. (2009). *Biomolecular Separation and Analysis*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.

Holtz, P., Westermann, E. (1959). Poisoning and detoxification by parathion and paraoxon. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 237, 211-221.

Horike, S., Lee, S. H., Nishimoto, T., Ahn, C. H. (2003). Self-assembly of colloids for plastic capillary electrochromatography chip. *Proceedings of the 7th International Conference on Micro Total Analysis Systems (μ -TAS 2003)*, 417-420, California, USA.

Huang, Y. Joo, Duhon, S., Heller, M., Wallace, B., Xu, X. (2002). Dielectrophoretic cell separation and gene expression profiling on microelectronic chip arrays. *Anal. Chem.* 74, 3362-3371.

Insektizide, 25.8.3, 547-550. In: *Pharmakologie und Toxikologie*. Lüllmann H., Mohr, K., Hein, L. (Editoren). Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2010.

Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 6, 88-95.

Johann, R.M. (2006). Cell trapping in microfluidic chips *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 408-412; DOI: 10.1007/s00216-006-0369-6.

Jokanović, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166, 3, 25, 139-160.

Kafi, A., Kimb, T.H., Anb, J.H., Choi, J.W. (2011). Electrochemical cell-based chip for the detection of toxic effects of bisphenol-A on neuroblastoma cells. *Biosens. Bioelectron.* 26, 3371-3375.

Kaufmann, W. (2003). Current status of developmental neurotoxicity: An industry perspective. *Toxicol. Lett.* 140, 161-169.

Kelly, K. M., Gross, R. A., Macdonald, R.L. (1990). Valproic acid selectively reduces the low-threshold (T) calcium in rat nodose neurons. *Neurosci. Lett.* 116, 233-8.

Khandurina, J., McKnight, T.E., Jacobson, S.C., Waters, L.C., Foote, R.S., Ramsey, J.M. (2000). Integrated system for rapid PCR-based DNA analysis in microfluidic devices. *Anal. Chem.* 72, 13, 2995-3000.

Khine, M., Lau, A., Zanetti, C.I., Seo, J., Lee, L.P. (2004). A single cell electroporation chip. *Lab Chip* 5, 38-43; DOI: 10.1039/B408352K.

Koester, P.J., Buehler, S.M., Stubbe, M., Tautorat, C., Niendorf, M., Baumann, W. Gimsa, J. (2010). Modular glass chip system measuring the electric activity and adhesion of neuronal cells-application and drug testing with sodium valproic acid. *Lab Chip* 10, 1579-1586.

Krause, G., Schreiber, E., Freund, I., Lehmann, M., Podssun, A., Homma, S., Baumann, W. (2002). Multiparametric neurosensor microchip. FENS, Paris.

Krause, G., Schreiber, E., Freund, I., Lehmann, M., Podssun, A., Homma, S., Baumann, W. (2003). Measurements of electrical activity of neuronal networks with a silicon based neurosensor chip. Si-MEA Denton.

Krnjevic, K., Schwartz, S. (1967). The action of γ -aminobutyric acid on cortical neurons. *Exp. Brain Res.* 3, 320-336.

Kushida, M., Sukata, T., Uwagawa, S., Ozaki, K., Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Morimura, K., Okuno, Y., Fukushima, S. (2005). Low dose DDT inhibition of hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in male rats: Possible mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208, 3, 285-94.

Lehmann, M., Baumann, W., Brischwein, M., Gahle, H. J., Freund, I., Ehret, R., Drechsler, S., Palzer, H., Kleintges, M., Sieben, U., Wolf, B. (2001). Simultaneous

measurement of cellular respiration and acidification with a single CMOS ISFET. *Biosens. Bioelectron.* 16, 195-203.

Löscher, W., (1981). Correlation between alterations in brain GABA metabolism and seizure excitability following administration of GABA aminotransferase inhibitors and valproic acid-a re-evaluation. *Neurochem.* 36, 1521-1527.

Löscher, W., Nau, H., Marescaux, C., Vergnes, M. (1984). Comparative evaluation of anticonvulsant and toxic potencies of valproic acid and 2-en-valproic acid in different animal models of epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* 99, 2-3, 211-218.

Madeira, M.C. (1984). Partition of parathion in synthetic and native membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 778, 49-56.

Maltsev, V.A., Rohwedel, J., Hescheler, J., Wobus, A.M. (1993). Embryonic stem cells differentiate *in vitro* into cardiomyocytes representing sinusoidal, atrial and ventricular cell types. *Mech. Develop.* 44, 1, 41-50.

Manz, A., Graber, N., Widmer, H.M. (1990). Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensor Actuat. B-Chem.* 1, 1-6, 244-248.

Maswiwat, K., Wachner, D. Gimsa, J. (2008). Effects of cell orientation and electric field frequency on the transmembrane potential induced in ellipsoidal cells. In *Bioelectrochem.* 74, 1, 130-141.

Matsuo, T., Wise, K.P. (1974). An integrated field effect electrode for biopotential recording. *IEEE Trans. Biomed. Eng. Vol. BME-21* 6, 485.

McDonald, R. L., Kelly, K. M. (1995). Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia* 36, 2-12.

Medoro, G., Manaresi, N., Leonardi, A., Altomare, L., Tartagni, M, Guerrieri, R. (2003). A Lab-on-a-chip for cell detection and manipulation. *IEEE Sensors J.*, 3, 3, 317.

Mokkapati, V.R.S.S., Zhang, L., Hanfoug, R., Mollinger, J., Bastemeijer, J., Bossche, A. (2009). Fabrication and testing of a TMMF S2030 based micro fluidic

device for single cell analysis. Third international conference on quantum, nano and Micro Technologies.

Morgan, H., Green, N.G., Hughes, M.P., Monaghan, W., Tan, T.C. (1997). Large-area travelling-wave dielectrophoresis particle separator. *J. Micromech. Microeng.* 7, 65-70.

Morgan, H., Izquierdo, A.G., Bakewell, D., Green, N.G., Ramos, A. (2001). The dielectrophoretic and travelling wave forces generated by interdigitated electrode arrays: analytical solution using Fourier series. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 34, 1553-1561.

Müller, T., Arnold, W.M., Schnelle, T., Hagedorn, R., Fuhr, G., Zimmermann, U. (1993). A traveling-wave micropump for aqueous solutions. Comparison of 1 g and µg results. *Electrophoresis* 14, 764-72.

Müller, T., Gradl, G., Howitz, S., Shirley, S., Schnelle, T., Fuhr, G. (1999). A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles. *Biosens. Bioelectron.* 14, 247-256.

Müller, T., Schnelle, T., Gradl, G., Shirley, S.G., Fuhr, G. (2000). Microdevice for cell and particle separation using dielectrophoretic field flow fractionation. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 23, 1, 47-59; DOI: [dx.doi.org/10.1081/JLC-100101435](https://doi.org/10.1081/JLC-100101435).

Müller, T., Pfennig, A., Klein, P., Gradl, G., Jäger, M., Schnelle, T. (2003). The potential of dielectrophoresis for single-cell experiments. *IEEE Eng. Med. Biol.* 51-61.

Murray, M., Butler, A.M. (1994). Hepatic biotransformation of parathion: Role of cytochrome P450 in N. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 792-799.

Na, L., Wartenberg, M., Nau, H., Hescheler, J., Sauer, H. (2003). Anticonvulsant valproic acid inhibits cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by increasing intracellular levels of reactive oxygen species. *Birth Defects Res. A*, 67, 174-180.

Nambiar, S., Yeow, J.T.W. (2011). Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1825-1832.

Ng, E.S., Davis, R.P., Azzola, L., Stanley, E.G., Elefanty, A.G. (2002). Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Commentary. Blood*, 106, 5, 1601-1603.

Okabe, S., Nilsson, K.F., Spiro, A.C., Segal, M., McKay, R.D.G. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*. *Mech. Dev.* 59, 1, 89-102.

OECD (2007). OECD Guideline for the testing of chemicals. Developmental Neurotoxicity Study. (http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788).

Krieger, R. (2001). Organophosphate Kinetics, Tabelle 46.2, 937. In: Handbook of pesticide toxicology; Principles, Band 2. Academic Press 2001, California, USA.

Pessayre, D., Mansouri, A., Berson, A., Fromenty, B. (2010). Mitochondrial Involvement in drug-induced liver injury. In: Adverse Drug Reactions. Handbook of Experimental Pharmacology, J. Uetrecht, (Ed.), 311-365, Springer, ISBN 978-3-642-00662-3, Heidelberg, Germany.

Pine, J. (1980). Recording action-potential from cultured neurons with extracellular micro-circuit electrodes. *J. Neurosci.* 2, 1, 19-31; DOI: 10.1016/0165-0270 (80) 90042-4.

Pirow, R. (2009). Biometrischer Abschlussbericht zum Verbundprojekt „Entwicklung prädikativer *in vitro* Tests zur sicherheitstoxikologischen Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität-DNT“, Teilprojekte 1-5. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Abt. ZEBET- Alternativmethoden zu Tierversuchen.

Poghossian, A., Ingebrandt, S., Offenhausser, A., Schoning, M. J. (2009). Field-effect devices for detecting cellular signals. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 4-48.

Rebl, H., Finke, B., Schroeder, K., Nebe, J.B. (2010). Time-dependent metabolic activity and adhesion of human osteoblast-like cells on sensor chips with a plasma polymer nanolayer. *Int. J. Artif. Organs* 33, 10.

Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P.A., Manz A. (2002). Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Anal. Chem.* 74,12, 2623-2636; DOI: 10.1021/Ac0202435.

Roche Xcelligence System. (2009). Cardiac-specific toxicity-real-time monitoring of adverse effects on cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. Roche Xcelligence system application note, 8, 1-10.

Rolletschek, A., Chang, H., Guan, K., Czyz, J., Meyer, M., Wobus, A.M. (2001). Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors. *Mech. Dev.* 105, 1-2, 93-104.

Rudnicki, M.A., McBurney, M.W. (1987). Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. In: Robertson E.J. (Hrsg.). *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach*. IRL Press, Oxford, 71-112.

Schjøtt, J. (2011). Adverse Effects of Drugs and Toxins on the Liver. In: *Liver Biopsy in Modern Medicine*, Dr. Yoshiaki Mizuguchi (Ed.), ISBN: 978-953-307-883-0.

Tominaga, T., Tominaga, Y., Ichikawa, M. (2001). Simultaneous multi-site recordings of neural activity with an inline multi-electrode array and optical measurement in rat hippocampal slices. *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.* 443, 317-322; DOI: 10.1007/s004240100707.

Russell, W.M.S., Burch, R.L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. 238, Methuen, London.

Schmück, D., Bausch, G. (2012). Comparison of fast algorithms for online spike sorting and its implementation in hardware, *Embedded World Conference 2008, Nürnberg, (in press)*.

Schnelle, T., Müller, T., Gradl, G., Shirley, S.G., Fuhr, G. (2000). Dielectrophoretic manipulation of suspended submicron particles. *Electrophoresis*, 21, 1, 66-73.

Schrott, R., Keuer, A., Tautorat, C., Krischker, D., Bausch, G., Taube, J., Beikirch, H., Baumann, W., Schreiber, E. (2005). Hard-and software concept for real-time

and embedded action potential analysis. Embedded World Conference 2005, WEKA Fachzeitschriftenverlag, 327-332.

Schrott, R., Bausch, G., Kirchner, K.P., Tautorat, C., Baumann, W., Weiss, D., Beikirch, H. (2006a). Evaluation system for neural data acquisition and analysis. International meeting on substrate-integrated micro electrode arrays, MEA Meeting 2006, 77-78.

Schrott, R., Bausch, G., Kirchner, K.P., Tautorat, C., Beikirch, H., Baumann, W. (2006b). Embedded real-time neural data acquisition and processing; Embedded World Conference 2006, Francis Verlag, 489-492.

Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A., Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. PNAS 97, 21, 11307-11312.

Sigworth, F.J., Klemic, K.G. (2002). Patch Clamp on a Chip. Biophys J. 82, 6, 2831-2832.

Sonntag, F., Schilling, N., Madera, K., Gruchowa, M., Klotzbach, U., Lindner, G., Horland, R., Wagner, I., Lauster, R., Howitz, S., Hoffmann, S., Marx, U. (2010). Design and prototyping of a chip-based multi-micro-organoid culture system for substance testing, predictive to human (substance) exposure. J. Biotechnol. 148, 1, 70-75.

Suehiro, J., Pethig, R. (1998). The dielectrophoretic movement and positioning of a biological cell using a three-dimensional grid electrode system. J. Phys. D: Appl. Phys. 31, 3298-3305.

Sukhorukov, V.L., Mussauer, H., Zimmermann, U. (1998). The effect of electrical deformation forces on the electroporation of erythrocyte membranes in low- and high-conductivity media. J. Membrane Biol. 163, 3, 235-245.

Sultatos, L. G., Murphy, S. D. (1983). Kinetic analyses of the microsomal biotransformation of the phosphorothioate insecticides chlorpyrifos and parathion. Fundam. Appl. Toxicol. 3, 16-21.

Stubbe, M., Holtappels, M., Gimsa, J. (2007). A new working principle for ac electro-hydrodynamic on-chip micro-pumps. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 40, 6850-6856.

Stubbe, M., Buehler, S.M., Baumann, W., Gimsa, J. (2010). Mikropumpen sowie Sensoren für Adhäsion und Proliferation von Zellen in Lab-on-a-Chip Systemen. In: Technische Systeme für die Lebenswissenschaften Technische Systeme für die Lebenswissenschaften: 15. Heiligenstädter Kolloquium, Heilbad Heiligenstadt, 27.09. - 29.09.2010, (Tagungsband). Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik, Heiligenstadt, S. 133-140.

Stubbe, M., Gimsa, J. (2011). A short review on ac-electro-thermal micropumps based on smeared structural polarizations in the presence of a temperature gradient. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 376, 97-101.

Talary, M.S., Burt, J.P.H., Tame, J.A., Pethig, R. (1996). Electromanipulation and separation of cells using travelling electric fields. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 29 2198-2203.

Terry, S.C. (1975). A gas chromatographic air analyzer fabricated on silicon wafer using integrated circuit technology. PhD thesis, Stanford University, USA.

Thedinga, E., Kob, A., Holst, H., Keuer, A., Drechsler, S., Niendorf, R., Baumann, W., Freund, I., Lehmann, M., Ehret, R. (2007). Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 33-44.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 5391, 1145-1147; DOI: 10.1126/science.282.5391.1145.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). Prevention, pesticides and toxic substances (7101). Health effects test guidelines OPPTS 870.6300 developmental neurotoxicity study EPA 712-C-98-239, 1998.

Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der

Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission. Das europäische Parlament und der Rat der europäischen Union-gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft, insbesondere auf Artikel 95, auf Vorschlag der Kommission, nach Stellungnahme des Europäischen Wirtschafts- und Sozialausschusses, nach Stellungnahme des Ausschusses der Regionen 2 gemäß dem Verfahren des Artikels 251 des Vertrags 3, 1 ABl. C 112 vom 30.4.2004, S. 92 und ABl. C 294 vom 25.11.2005, S. 38. 2 ABl. C 164 vom 5.7.2005, S. 78. 3. Stellungnahme des Europäischen Parlaments vom 17. November 2005 (noch nicht im Amtsblatt veröffentlicht).

Vilkner, T., Janazek, D., Manz, A. (2004). Micro total analysis systems. Recent developments. *Anal. Chem.* 76, 3373-3386.

Vreugdenhil, M., van Veelen, C.W.M., van Rijen, P.C., da Silva, F.H.L., Wadman, W.J. (1998). Effect of valproic acid on sodium currents in cortical neurons from patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 32, 1-2, 309-320.

Wallace, K.B. (2008). Mitochondrial off targets of drug therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 7, 361-366; DOI: 10.1016/j.tips.2008.04.001.

Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.

Wobus, A.M., Wallukat, G., Hescheler, J. (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca^{2+} channel blockers. *Differentiation* 48, 3, 173-182.

Wobus, A.M., Kaomei, G., Shan, J., Wellner, M.C., Rohwedel, J., Guanju, J. Fleischmann, B., Katus, H.A., Hescheler, J., Franz, W.M. (1997). Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29, 1525-1539.

Wobus, A. (2001). Potential of embryonic stem cells. *Mol. Aspects Med.* 22, 149-164.

Woolley, A.T., Hadley, D., Landre, P., deMello, A.J., Mathies, R.A., Northrup, M.A. (1996). Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal. Chem.* 68, 4081-4086.

Wolf, B., Kraus, M., Brischwein, M., Ehret, R., Baumann, W., Lehmann, M. (1998). Biofunctional hybrid structures-cell-silicon hybrids for applications in biomedicine and bioinformatics. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 46, 2, 215-225.

Wolf, B., Brischwein, M., Grothe, H., Stepper, C., Ressler, J., Weyh, T. (2006). Lab-on-a-chip Systems for Cellular Assays. In: Urban, G. (Ed.), *BioMEMS*. Springer, Dordrecht (NL), 269-308.

Yehya H. Ghallab, Y., H., Badawy, W. (2010). *Lab-on-a-chip: techniques, circuits, and biomedical applications*. Norwood, MA: Artech House.

Ying, Q. L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., Smith, A. (2003a). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat. Biotechnol.* 21, 183-186.

Ying, Q. L., Smith, A. (2003b). Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Method. Enzymol.* 365, 327-341.

10. Liste eigener Veröffentlichungen

10.1 Publikationen

Buehler S.M., Stubbe, M., Gimsa, U., Baumann, W., Gimsa, J. (2010). Multifunktionale Glas-Neurochips: Eine Alternative zum Tierversuch. Steinbeis-Transferzentrum, Zell-Manipulations- und Monitoring-Systeme (CMMS). Transfer. Das Steinbeismagazin, S. 8-9, 1/2010, ISSN 1864-1768, Straub Druck + Medien AG, Schramberg.

Buehler, S.M., Stubbe, M., Gimsa, U., Baumann, W., Gimsa, J. (2011). A decrease of intracellular ATP is compensated by increased respiration and acidification at sub-lethal parathion concentrations in murine embryonic neuronal cells: Measurements in metabolic cell-culture chips. *Toxicol. Lett.* 207, 2, 182-190. *Impact factor*: 3.6.

* Koester, P., * Buehler, S.M., Stubbe, M., Tautorat, C., Niendorf, M., Baumann, W., Gimsa, J. (2010). Modular glass chip system measuring the electric activity and adhesion of neuronal cells-application and drug testing with sodium valproic acid. *Lab Chip* 10:1579-1586; DOI: 10.1039/b923687b. *Impact factor*: 6.5.

*: *equally contributing*

Elter, P., Weihe, T., Buehler, S.M., Gimsa, J., Beck, U. (2011). Low fibronectin concentrations overcompensate for reduced initial fibroblasts adhesion to a nanoscale topography: Single-cell force spectroscopy. *Colloids Surf. B* 95, 82-89; DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.02.026. *Impact factor*: 2.9.

Stubbe, M., Buehler, S.M., Baumann, W., Gimsa, J. (2010). Mikropumpen sowie Sensoren für Adhäsion und Proliferation von Zellen in Lab-on-a-Chip Systemen. Technische Systeme für die Lebenswissenschaften, 15. Heiligenstädter Kolloquium, 133-140; ISBN 978-3-00-032249-5.

10.2 Konferenzbeiträge

Koester, P.J., Buehler, S.M., Sakowski, J., Tautorat, C., Altrichter, H., Baumann, W., Gimsa, J. (2007). Modular glass chip system for the acquisition of the electric activity and physiological parameters of differentiated stem cells. In: Proceedings of the 14th World Congress on Alternatives to Animal Testing, Linz, Austria, September 28-30, 2007, ALTEX: 24 (3), 208-209, ISBN: 0946-7785.0.

Buehler, S.M., Koester, P.J., Sakowski, J., Tautorat, C., Altrichter, H., Baumann, W., Gimsa, J. (2007). Bio-analytic silicon chips for the detection of developmental-neurotoxic effects of chemicals and drugs in the context of the European REACH program. In: Proceedings of the 14th World Congress on Alternatives to Animal Testing, Linz, Austria, September 28-30, 2007, ALTEX: 24 (3), 190, ISBN: 0946-7785. 7. Appendix B - Author's scientific activity, Conference contributions 157.

Koester P.J., Buehler, S., Tautorat, C., Sakowski, J., Schrott, R., Baumann, W., Gimsa, J. (2008). A new glass chip system acquiring electric activity and physiological parameters of differentiated stem cells (II2-O-005). In: Proceedings of the 13th International Biotechnology Symposium (IBS) and Exhibition, October 2008, Dalian, China, Journal of Biotechnology 136S, 126-127, ISSN 0168-1656.

Koester P.J., Buehler, S., Tautorat, C., Sakowski, J., Schrott, R., Baumann, W., Gimsa, J. (2008). A new glass chip system acquiring electric activity and physiological parameters of differentiated stem cells (II2-O-005). In: Proceedings of the 6th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays, July 2008, Reutlingen, 315-316, ISBN 3-938345-02-0.

10.3Poster

Baumann W., Ehret, R., Thedinga, E., Kob, A., Drechsler, S., Podssun, A., Bühler, S., Tautorat, C., Gimsa, J., Schrott, R., Beikirch, H., Freund, I. Lehmann, M. (2006). Cell monitoring systems with multiparametric CMOS biosensorchips. 5th international meeting on substrate-integrated microelectrode arrays. MEA Meeting 2006: 4-7th July 2006, Reutlingen, Germany.

Buehler S.M., Altrichter, H., Koester, P.J., Tautorat, C., Ehret, R., Baumann, W., Gimsa, J. (2007). Bio-analytic silicon chips for the detection of developmental-neurotoxic effects of chemicals and drugs in the context of the European REACH program. 14th Congress on Alternatives to Animal Testing Linz-2007: 28-30th September 2007, Linz, Austria.

Koester, P.J., Buehler, S.M., Sakowski, J., Tautorat, C., Altrichter, H., Baumann, W., Gimsa, J. (2007). Modular-glass-chip-system for the acquisition of the electric activity and physiological parameters of differentiated stem cells. 5th international meeting on substrate-integrated microelectrode arrays. 14th congress on alternatives to animal testing Linz -2007: 28-30th September 2007, Linz, Austria.

Bonk S.M., Bühler, S.M., Stubbe, M., Baumann, W., Gimsa, J. (2010). Aktuatorik und Sensorik für die Überwachung metabolischer Parameter in 3D-Zellkultursystemen. 15. Heiligenstädter Kolloquium: Technische Systeme für die Lebenswissenschaften. September 2010, Heiligenstadt.

11. Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. habil. Jan Gimsa dafür danken, dass er es mir ermöglicht hat am Lehrstuhl für Biophysik zu promovieren. Weiterhin möchte ich ihm und Dr. Werner Baumann für ihre freundliche und kompetente Art der Führung und Wissensvermittlung während der letzten Jahre danken. Frau PD Dr. U. Gimsa möchte ich für ein Volontariat am FBN-Dummerstorf im Rahmen der Erfüllung meiner Auflagen für die MNF sowie für ihre Unterstützung bei der Erstellung von Veröffentlichungen danken. Herrn PD Dr. Udo Walther bin ich für seine Diskussionsbereitschaft bei medizinischen und toxikologischen Fragestellungen dankbar.

Besonderer Dank geht an Marco Stubbe, der mir bei der Lösung theoretischer, physikalischer und statistischer Angelegenheiten immer ein guter Diskussionspartner war. Dr. Philipp Köster möchte ich für die Einführung in das Arbeiten mit der Zellkultur und die Detektion zellphysiologischer Parameter mittels LOC danken. Carsten Tautorat und Thomas Kröger bin ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft beim Lösen elektrotechnischer Fragestellungen dankbar. Frau Dr. Katrin Haysen möchte ich danken, dass sie mir während der Bearbeitung des DNT-Verbundprojektes als Verbindungsperson des ZEBET stets eine gute Ratgeberin war.

Den Kolleginnen und Kollegen am Lehrstuhl für Biophysik danke ich für die angenehme Atmosphäre sowie ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

12. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Entwicklung nicht invasiver *in vitro*-Tierversuchersatzmethoden für sicherheits-toxikologische Untersuchungen unter Verwendung von Lab-on-Chip-Systemen“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe sowie ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe. Die vorliegende Arbeit wurde in dieser oder anderer Form bisher nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt.

Sebastian Bühler